

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS

“VICTORIA DE GIRÓN”

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE
NEUROEPO INTRANASAL EN MODELOS DE ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias
Médicas

Autor: Dra. Yamila Rodríguez Cruz

Tutor: Dr. C. Julio César García Rodríguez

La Habana, 2018

SÍNTESIS

El incremento de la expectativa de vida conlleva a un mayor riesgo de padecer afecciones relacionadas con el envejecimiento, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA), que constituye la causa más común de demencia. Esta enfermedad se caracteriza por un deterioro progresivo e irreversible de la memoria, alteraciones en el comportamiento, pérdida de la habilidad motora, del lenguaje y de la percepción de la realidad. Hasta el momento no se dispone de opciones terapéuticas efectivas para su prevención y tratamiento. La eritropoyetina endógena (EPO), inicialmente conocida por actuar sobre células eritroides en la médula ósea y estimular la eritropoyesis, también promueve la neurogénesis y neuroprotección participando en la neuroplasticidad cerebral fisiológica y reactiva a daños diversos. Se han desarrollado diferentes tipos de EPO humana recombinante (EPOhr) que no inducen eritropoyesis, incluyendo la eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico (NeuroEPO). Ésta es capaz de alcanzar rápidamente el cerebro después de su administración por vía intranasal (IN), aproximadamente en 5 min. Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidenciaron el efecto neuroprotector de la NeuroEPO por vía IN en el hipocampo y la corteza cerebral, en modelos no transgénico y transgénico de EA. La eficacia y seguridad de la NeuroEPO demostrada en estudios anteriores, unida a su aplicación no invasiva, sugieren un amplio espectro para su uso clínico y profiláctico, incluyendo el tratamiento de las fases aguda y crónica de la EA.

ABREVIATURAS

AChEI: inhibidores de la acetilcolinesterasa

ADAM: una desintegrina y metaloproteinasa (por sus siglas en inglés)

Akt: proteína quinasa B

ANOVA: análisis de la varianza

Aph-1: anterior pharynx-defectiva 1 (por sus siglas en inglés)

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora de amiloide (por sus siglas en inglés)

APPswe: modelo de ratón transgénico Tg2576 de familia suiza (por sus siglas en inglés)

ATP: adenosintrifosfato

Ataxia SCA-2: ataxia espino cerebelosa tipo 2

Asn: aminoácido Asparagina

β A: péptido β amiloide

β A40: péptido β -amiloide de 40 residuos de aminoácidos

β A-42: péptido β -amiloide de 42 residuos de aminoácidos

BACE: enzima secretasa β

BCL: linfoma de células B

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés)

BHE: barrera hematoencefálica

CA1: cuerno de Amón, sector 1

CEPO: eritropoyetina carbamilada

CIM: Centro de inmunología Molecular

CR-3: receptor de la fracción 3 del complemento

CR-21: cromosoma 21

DE: desviación estándar

DNA: ácido desoxirribonucleico

EA: enfermedad de Alzheimer

ELISA: ensayo por Inmuno absorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)

EPO: eritropoyetina endógena

EPOhr: eritropoyetina Humana Recombinante

EPOR : receptor de eritropoyetina

ERO: especies reactivas del oxígeno

FAD: enfermedad de Alzheimer familiar

FHP: filamento helicoidal pareado

GABA: ácido gamma amino butírico (por sus siglas en inglés)

GDNF: factor neurotrófico derivado de la Glía (por sus siglas en inglés)

GEK3: glicógeno sintetasa kinasa 3 (por sus siglas en inglés)

GFAP: proteína ácida glio fibrilar (por sus siglas en inglés)

GPX: glutatióñ peroxidasa

GSK 3: glucógeno sintasa quinasa 3 (por sus siglas en inglés)

GTP: trifosfato de guanosina

hAPPm: mensajero de la proteína precursora de amiloide humana

Hb: hemoglobina

HIF-1: factor inducible de hipoxia de tipo 1

Hto: hematocrito

H_2O_2 : peróxido de hidrógeno

I¹²⁵: yodo 125

ICV: vía de administración intracerebro-ventricular

IGF-1: factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (por sus siglas en inglés)

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleucina

IM: vía de administración intramuscular

IN: vía de administración intranasal

IR: infrarrojo

IV: vía de administración intravenosa

Kg: kilogramos

KDa: kilodalton

LCR: líquido cefalorraquídeo

Leu: aminoácido Leucina

LTP: potenciación a largo plazo

Lys: aminoácido Lisina

Met: aminoácido Metionina

MHCII: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

NeuroEPO: eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido en ácido siálico

NGF: factor de crecimiento nervioso (por sus siglas en inglés)

NMDA-R: receptor N-Metil D-Aspartato (por sus siglas en inglés)

NO: óxido nítrico (por sus siglas en inglés)

NT-3: neurotrofina-3

ONF: ovillos neurofibrilares

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (por sus siglas en inglés)

PS1: presenilina 1

PS2: presenilina 2

PVC: cloruro de polivinilo (por sus siglas en inglés)

RE: retículo Endoplasmático

RNAm: ácido ribonucleico mensajero

sAPP β : fragmento de proteína precursora de β amiloide soluble

seg: segundo

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

Tau: proteína tau

TBS: tris salino tamponado

TNF- α : factor de necrosis tumoral- alfa (por sus siglas en inglés)

UI: unidades internacionales

β -CTF: fragmento C- terminal de la β -secretasa

γ -CTF: fragmento C- terminal de la γ -secretasa

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
Planteamiento del problema	14
Hipótesis	15
Objetivos.....	15
Aporte teórico de la tesis	15
Aporte metodológico	16
Aporte práctico/social.....	16
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
Definición y características del envejecimiento	17
La Enfermedad de Alzheimer.....	22
1. ¿Cuáles son las causas de la enfermedad de Alzheimer?	24
2. Molécula precursora del amiloide	24
3. Factores genéticos de predisposición a la enfermedad de Alzheimer	26
4. Teoría amiloidogénica	27
6. Teoría de la acumulación de Tau.....	29
Modelos experimentales.....	32
Neuroprotección	33
Eritropoyetina	33
Vías para hacer llegar moléculas al sistema nervioso central	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
Animales	39
Aplicación intranasal	40
Administración de medicamentos e inyecciones.....	41

Diseño experimental	41
Las drogas y series experimentales	42
Pruebas conductuales.....	44
Estudios bioquímicos.....	49
Ensayos de ELISA.....	51
Estudios histológicos	52
Procedimiento inmunohistoquímico.....	54
Análisis estadísticos.....	55
RESULTADOS	58
Experimento 1: Efecto de la NeuroEPO en modelo agudo de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del peptido amiloide β ₂₅₋₃₅	58
DISCUSIÓN	68
RESULTADOS	73
Experimento 2: Efecto neuroprotector de la NeuroEPO en modelo transgénico Tg 2576 de enfermedad de Alzheimer.....	73
DISCUSIÓN	88
CONSIDERACIONES GENERALES DE LA DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES.....	99
RECOMENDACIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	101

INTRODUCCIÓN

El planeta Tierra está poblado por más de 7 000 millones de humanos. En el mundo el promedio de vida es de 69 años, la cual está asimétricamente dividida en 80 años para los denominados países desarrollados mientras que para los catalogados como en desarrollo y no desarrollados son de solo 67 y 57 años respectivamente. Teniendo en cuenta que es la edad biológica un factor de riesgo no modificable para las enfermedades neurodegenerativas, al lograr en la región de Latinoamérica indicadores de desarrollo, estos llevarán a enfrentar la problemática social del envejecimiento poblacional y los problemas que estos generan tanto para la sociedad como para su núcleo fundamental, la familia¹.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que aumenta en la actualidad con el desarrollo mundial y el envejecimiento demográfico. La EA se diagnostica con mayor frecuencia en las personas de más de 65 años de edad, aunque es menos frecuente la EA puede aparecer entre los 35-40 años de edad. En el año 2016, había en el mundo aproximadamente 47 millones de personas con algún tipo de demencias, esperando un incremento de más de 131 millones para el año 2050 y se prevé que la EA afecte a una de cada 85 personas². En el año 2016 existían en Cuba 160 mil pacientes con algún tipo de demencias, diagnosticándose aproximadamente 28 000 casos nuevos por año, para un costo anual de 712 millones de dólares³.

Los síntomas de la EA incluyen la pérdida de la memoria, la imposibilidad de comunicación o de realizar tareas rutinarias, alteración de la personalidad y el estado vegetativo. Las características histopatológicas encontradas en el cerebro de los

pacientes con EA son: la presencia de placas seniles extracelulares, ovillos neuro fibrilares (ONF) intracelulares, reducción de la sinapsis, degeneración neuronal y reducción del volumen cerebral. Esta realidad, tiene impacto negativo en la productividad del trabajo, en el costo de la salud pública y el desarrollo sostenible en general de la sociedad^{4,5}.

A nivel mundial a pesar de los sostenidos esfuerzos tanto académicos como de la industria farmacéutica no se dispone de un tratamiento efectivo contra la EA. Las drogas aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) son la Rivastigmine, Donepezil, Galantamine y Memantine con efectos beneficiosos probados solo en las etapas iniciales de la enfermedad⁶.

Estos medicamentos pertenecen a dos grupos: los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) y los antagonistas de los receptores de ácido N-metil-D-aspártico (NMDAR). Los AChEI incluyen en este grupo el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina⁷. El mecanismo de acción de los AChEI es aumentar la transmisión colinérgica mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa en la hendidura sináptica y por ello podrían incrementar ligeramente la capacidad cognitiva de los pacientes con EA. La memantina es un antagonista del receptor NMDAR que reduce la excitotoxicidad por el bloqueo de este receptor inotrópico, ya que en la EA los niveles del neurotransmisor glutamato son patológicamente elevados. Ambos grupos de medicamentos están indicados para el tratamiento de pacientes con EA moderada⁸.

Sin embargo, se ha demostrado que ninguno de estos fármacos aprobados representa realmente una cura para la enfermedad, ya que su efecto es solo paliativo y su eficacia disminuye con el tiempo^{9,10}.

La eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) se emplea en pacientes con fines eritropoyético desde la década de los años 80 del pasado siglo por vía subcutánea e intravenosa. En dosis altas puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y ejercer un efecto neuroprotector^{11,12}. En general la molécula es bien tolerada y entre los efectos adversos más importantes reportados por su administración sistémica se encuentra la hipertensión arterial, que parece estar relacionado con el aumento de la viscosidad sanguínea por el aumento de la masa globular. La eritropoyetina (EPO) es expresada en el cerebro y regulada por el factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1), el cual es activado por una variedad de estresores^{13,14}.

La EPOhr posee actividad neurotrófica y disminuye la excitabilidad neuronal, la cual se encuentra involucrada en diversas formas de lesión del cerebro. Promueve la angiogénesis ya que induce resistencia en las células endoteliales a través de la afinidad que tiene con su receptor en los vasos sanguíneos, estimulando la formación de capilares; así como tiene acción antiapoptótica dada por sus efectos en el control del balance de expresión de moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, la disminución de la expresión de genes pro-apoptóticos y la inhibición de la actividad de las caspasas 8, 1 y 3, relacionadas con la liberación de citocromo c de la mitocondria¹⁵. Su efecto neuroprotector se produce por su actividad antiinflamatoria mediante la regulación de genes inflamatorios¹⁶.

En estudios preclínicos y clínicos previos se demostró el efecto beneficioso de la EPOhr en diversas enfermedades en modelos de animales con hemorragia subaracnoidea¹⁷, trauma craneoencefálico¹⁸, daño de la médula espinal¹⁹ además reduce el daño neuronal funcional en modelos de esclerosis múltiple²⁰ y mejora la neuropatía del diabético²¹. También, tiene acción cardioprotectora en el infarto del miocardio, donde se reduce el

volumen del infarto²², se ha reportado su uso como tratamiento en la esquizofrenia²³, la hipoxia perinatal²⁴ y en la esclerosis múltiple²⁵.

Sin embargo, una complicación potencial de un tratamiento sistémico a dosis repetida con EPOhr está dada por el aumento de la actividad hematopoyética en pacientes que no tienen anemia, lo que constituye un problema a resolver en la práctica médica para usar esta molécula como neuroprotector.

La molécula de EPOhr tiene una vida media larga debido a la glicosilación que posee, pero a su vez también permite su unión al receptor y ejercer así su acción eritropoyética. Por ejemplo, en los ratones que sobre expresan la EPO, aumentó los niveles del hematocrito y el volumen del infarto después de la isquemia cerebral²⁶. Por tal motivo se evalúan como citoprotectores varias isoformas de la EPOhr con mayor o menor cantidad de ácido siálico u otras modificaciones en su estructura, que mantengan su efecto citoprotector; pero que disminuya su efecto eritropoyético. Son ejemplo de éstas isoformas la asialoeritropoyetina (asialo EPO) y la eritropoyetina carbamilada (CEPO)²⁷.

La asialo EPO fue obtenida por remoción completa de los ácidos siálicos, lo que provoca una disminución de la vida media de la hormona en circulación sanguínea sin cambios en su actividad neuroprotectora^{28,29}.

La CEPO pierde su actividad hematopoyética por carbamilación en los aminoácidos de lisina, pero conserva su acción protectora de otros tejidos lo que avala su uso a largo plazo para tratar enfermedades crónicas. Esta molécula se ha empleado en modelos de trauma cerebral y en estados agudos de isquemia e isquemia reperfusión y se confirmó que tiene un efecto neuroprotector igual que la EPOhr³⁰.

En estudios realizados en estados crónicos de hipoxia en ratas, quedó demostrado que la CEPO no tiene efecto adverso sobre el peso corporal de los animales, la supervivencia y el hematocrito³¹. También se observó su efecto modulador de la sinapsis en modelo transgénico de EA comparándola con la EPOhr³².

En Cuba se desarrolló por el Centro de Inmunología Molecular (CIM) la producción de la EPOhr. Durante este proceso se obtienen varias isoformas con niveles diferente de ácido siálico. Cuando el contenido de ácido siálico por mol de proteína es menor de 10, se considera que ésta EPOhr tiene insuficiente protección para ser usada como agente eritropoyético, ya que su vida media en sangre será relativamente corta por la rápida degradación en el hígado. Esta molécula ha sido denominada como NeuroEPO que es muy similar a la endógena producida por los astrocitos del cerebro humano por presentar menor peso molecular y menor contenido de ácido siálico³³.

La NeuroEPO hasta el presente, constituye el único derivado no eritropoyético de la eritropoyetina que no tiene modificaciones químicas en su estructura. Su acción se relaciona con los mecanismos de la neuroprotección endógena, así como su posible participación en la reparación en los procesos patológicos agudos como la isquemia cerebral o en los crónicos como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer y en las enfermedades genéticas como la ataxia espinocerebelosa tipo 2 (Ataxia SCA-2)³⁴.

Las potencialidades que tiene la eritropoyetina en su variante NeuroEPO aplicada por vía IN ha demostrado ser segura, avalada por estudios de toxicidad a dosis única y repetida en modelos animales³⁵. Se realizó además ensayo clínico Fase I-II en voluntarios sanos con resultados satisfactorios³⁶. En el ensayo clínico de la Ataxia SCA2, los pacientes mejoran la coordinación de movimientos, la marcha, el habla, las

funciones fronto ejecutivas y la latencia sacádica de la acción del cerebelo sobre los movimientos oculares³⁷. Está en desarrollo el ensayo clínico Fase I-II en pacientes con infarto cerebral en dos hospitales (Hospital Nacional en La Habana y Gustavo Aldereguía en Cienfuegos)³⁸.

La NeuroEPO por vía IN alcanza el cerebro rápidamente, no estimula la eritropoyesis después de los tratamientos agudos repetidos y se demostró el paso al cerebro en modelos en roedores y en primates no humanos^{39,40}. Se ha demostrado que esta molécula, en dosis de 500 µg/Kg de peso corporal (equivalente a 50 000 unidades eritropoyéticas) no estimula la eritropoyesis en ratones⁴¹. El mecanismo a través del cual la NeuroEPO hace su acción no está totalmente descrito, aunque existen evidencias de su interacción con el receptor de la EPO en células del Sistema Nervioso Central (SNC)^{42,43}.

El estudio de las variantes genéticas ha permitido proponer una hipótesis de trabajo en la que el péptido amiloideo podría ser el causante de la patología. Además ha permitido generar y analizar una serie de modelos transgénicos conteniendo dos o tres genes humanos mutantes (APP, PS1 y Tau) que si bien son importantes y tal vez no tenemos nada mejor, pero se alejan en muchos aspectos de la patología humanas⁴⁴.

Las anteriores evidencias reportadas permiten plantearnos la hipótesis que la NeuroEPO tiene un efecto protector contra la enfermedad de Alzheimer.

Planteamiento del problema

Resultados alcanzados recientemente han demostrado clínicamente la seguridad de una formulación nasal de la EPO cuyo principio activo es la NeuroEPO en el ensayo clínico

fase I en voluntarios sanos⁴⁵. A pesar de ello actualmente no se ha establecido ningún fármaco con categoría de neuroprotector, por lo que la formulación nasal Neuro-EPO como es un nuevo producto, que aspira a esta categoría, se hace necesario establecer según requisitos de las autoridades regulatorias, los niveles de eficacia y de seguridad preclínicas en diversos modelos de animales, lo cual constituye un requisito previo para su evaluación en ensayos clínicos en humanos. ¿Podrá la formulación de NeuroEPO intranasal ejercer su efecto neuroprotector en modelos animales de enfermedad de Alzheimer?

Hipótesis

La NeuroEPO por vía nasal protege las poblaciones celulares corticales y subcorticales en modelos de enfermedad de Alzheimer.

Objetivos

1. Evaluar el efecto neuroprotector de la NeuroEPO en ratones no transgénicos de la enfermedad de Alzheimer.
2. Evaluar el efecto neuroprotector de la NeuroEPO en modelo en ratones transgénicos Tg25-76 APPswe.

Aporte teórico de la tesis

Se demuestra por primera vez el efecto beneficioso que tiene la aplicación de una molécula de la Biotecnología cubana (NeuroEPO), de acceso rápido al SNC aplicada por vía IN para neuroproteger el tejido cerebral, además de diseñar una metodología de

evaluación lógica en modelos transgénicos y no transgénicos de la enfermedad de Alzheimer.

Aporte metodológico

Se ha desarrollado una metodología experimental acorde al objetivo fundamental del trabajo, en la cual se destacan, *métodos bioquímicos* para la determinación de los niveles de EPO en fluidos y tejidos, *métodos conductuales* para investigar la incidencia en marcadores del daño neurológico y *estudios histológicos* para determinar el daño en estructuras del SNC. Su enfoque multidisciplinario, el orden lógico de la estrategia experimental y el gran volumen de trabajo desarrollado con el objetivo de cumplir los objetivos trazados.

Aporte práctico/social

Los resultados presentados en esta tesis permitieron la elaboración de la documentación necesaria para la presentación y aprobación por el órgano regulatorio cubano CECMED para el desarrollo de un ensayo clínico en ejecución con el uso de la Neuro EPO como neuroprotector en el tratamiento en fase inicial estadio I y II de la EA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Definición y características del envejecimiento

Las definiciones de envejecimiento coinciden en que consiste en un conjunto de transformaciones, cambios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos, sociales, psicológicos y funcionales que aparecen en el organismo a lo largo de la vida como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos y que causan una disminución de la probabilidad de supervivencia y se reduce la capacidad fisiológica de autorregulación, de reparación y de adaptación antes situaciones del medio, procesos en los que juega un papel importante el sistema nervioso⁴⁶.

Las propuestas de teorías que tratan de explicar el proceso de envejecimiento se apoyan en mecanismos fisiológicos, bioquímicos, metabólicos y genéticos. Por la naturaleza multicausal del envejecimiento, resulta difícil que una única teoría pueda explicar todos sus mecanismos. Entre los mecanismos fisiológicos propuestos se encuentran la teoría del deterioro orgánico y la inmunobiológica y entre los bioquímicos y metabólicos se encuentran la teoría de la acumulación de productos de desecho, la teoría de las interconexiones o del entrecruzamiento y la teoría de los radicales libres, estrés oxidativo y daño mitocondrial. Entre las propuestas de teorías genéticas, las que actualmente reciben gran atención, se encuentra la teoría de la acumulación de errores, la teoría de la mutación somática a partir de las alteraciones del ADN y la teoría de la programación genética^{47,48}. Existen otras teorías como la neuroendocrina y la inmunológica que intentan explicar el envejecimiento pero han sido criticadas por la falta de evidencias⁴⁹.

Al analizar el proceso de envejecimiento se debe diferenciar el envejecimiento fisiológico relacionado exclusivamente con los cambios que se producen en los órganos y sistemas del organismo con el paso del tiempo del envejecimiento caracterizado por la presencia de alteraciones secundarias a enfermedades o influencias del medio⁵⁰.

En el envejecimiento la mayoría de los órganos vitales sufren atrofia o degeneración, el sistema inmune se debilita y el organismo es más susceptible a infecciones, traumas u otras situaciones de estrés. La incidencia de cáncer aumenta de forma significativa con la edad y se produce una pérdida de la visión, audición, memoria, coordinación motora y otras funciones neuronales⁵¹.

Se ha demostrado que tanto las enfermedades neurodegenerativas como las alteraciones cognitivas asociadas a la edad, son reflejo de la debilidad de ciertas poblaciones neuronales⁵². La atrofia y la pérdida de peso cerebral guardan relación con las afecciones neurológicas e intelectuales que se producen durante el proceso de envejecimiento⁵³. La pérdida de neuronas corticales que se produce durante el envejecimiento normal, la pérdida de dendritas de las pirámides corticales y la disminución del número de espinas dendríticas contribuye a una disminución general de las conexiones sinápticas⁵⁴.

Las aglutinaciones u ovillos de neurofibrillas (ONF) ocupan el citoplasma de células piramidales y desplaza a otros organitos citoplasmáticos. Cada ONF está formado por un par de filamentos enrollados en forma helicoidal pareado (FHP) y pueden encontrarse en menor proporción en el neurópilo, en axones mielinizados y en botones sinápticos anormales. La proteína asociada a los microtúbulos (tau) es el componente estructural más importante de los FHP y en ella se presentan cambios conformacionales

patológicos dados principalmente por hiperfosforilación y truncamiento del extremo carboxilo (proteólisis endógena), dando lugar a especies de peso molecular bajo que resultan tóxicos a las células nerviosas. Las aglutinaciones son más notables en el hipocampo y en la corteza cerebral pero también en las zonas grises más profundas como el hipotálamo y la sustancia reticular del tallo cerebral⁵⁵.

Las placas neuríticas o seniles tienen una localización fundamentalmente extracelular y están principalmente compuestas de diferentes especies de fibrillas β -amiloide (β A) localizadas centralmente, rodeada de fibras gruesas argentófilas y la mayoría tienen una red capilar contigua. Se observan múltiples neuritas distróficas engrosadas que rodean las fibras huecas de sustancia amiloide y contienen FHP, lisosomas lamelares y mitocondrias degenerativas; así como astrocitos y microglías reactivos. Una parte sustancial de β A no es fibrilar pero soluble y forma oligómeros de diferente complejidad que son tóxicos a las células nerviosas⁵⁶.

La aparición de la lipofucsina es un fenómeno característico de la célula que envejece. A medida que avanza la edad se encuentran grandes cantidades de lipofucsina en el soma de las neuronas. Es una inclusión citoplasmática de color parduzco y representan residuos insolubles de la actividad lisosomal (cuerpos residuales). Al microscopio electrónico se visualiza como un cuerpo heterogéneo de color negro intenso, rodeado por una membrana donde alternan partículas densas y lípidos formando gotas o membranas enrolladas sobre sí mismas. Químicamente consiste en una agregación intracelular de lípidos, proteínas, carbohidratos y trazas de metales imposibles de degradar que contiene además muchos aminoácidos y enzimas como la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y gránulos lipoides que son los principales precursores de los pigmentos de lipofucsina⁵⁷.

Se conoce que durante el envejecimiento normal aumentan las cantidades de neuroglías en diversas regiones del encéfalo en los humanos, monos y roedores. En la corteza cerebral se produce un incremento en el número y tamaño de astrocitos y microglías. Ambas células gliales desempeñan una función neuroprotectora, pero en respuesta a las alteraciones neuronales ocupan el parénquima que deja libre el tejido neuronal. Se observa un aumento de los astrocitos que expresan proteína ácida glio fibrilar (GFAP). También se produce un incremento del contenido gliofibrilar de los astrocitos (gliosis fibrosa), aumento fibroso que primero se observa en el estrato molecular de la corteza cerebral pero que también afecta a las restantes capas en la atrofia senil más avanzada⁵⁸.

Entre las microglías, son las activadas, las que sobre-expresan interleucina 1 (IL-1) y tienen características de células fagocíticas, las que fundamentalmente se incrementan durante el envejecimiento. Se plantea que esta hipertrofia de algunas neuroglías y la disminución del agua extracelular en el tejido cerebral durante el envejecimiento pueden contribuir a la disminución metabólica cerebral, tal vez alterando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica⁵⁹. Se ha demostrado una disminución de los sitios de fijación de glucocorticoides en las células de neuroglías lo que tal vez refleje un efecto indirecto de los cambios microambientales⁶⁰.

Dentro de los cambios neurobioquímicos que se producen durante el envejecimiento se encuentran alteraciones en el transporte de aminoácidos de la sangre a la corteza frontal y se alteran gran cantidad de neurotransmisores como la disminución de acetil-colino-transferasa, ácido γ amino butírico (GABA) y de enzimas sintetizadoras de catecolaminas. Algunos receptores de neurotransmisores están disminuidos en el hipotálamo e hipocampo⁶¹.

Se ha descrito un aumento en las cantidades de glutamato (uno de los principales neurotransmisores excitadores del SNC) en la corteza de ratas envejecidas y en cerebros envejecidos una disminución de su recaptación por neuronas. El aumento del glutamato extracelular puede conducir a procesos de excitotoxicidad tanto en neuronas como en glías produciendo su muerte. Estos procesos de excitotoxicidad se producen por cambios en la homeostasis del calcio y la inducción de cascadas apoptóticas⁶².

La disminución del estado cognitivo durante el envejecimiento se ha relacionado también con la disfunción de homeostasis del calcio fundamentalmente en el hipocampo. En el cerebro envejecido de murinos se ha observado un aumento del calcio dentro de la neurona provocando una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que conllevan a una disminución de la transmisión sináptica, lo que puede ayudar a la pérdida cognitiva observada en el envejecimiento cerebral. Hay una progresiva disminución de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), así como de los factores de crecimiento insulinoides de tipo 1 (IGF-1), todo lo cual puede contribuir al desarrollo de los cambios neurotóxicos observados en el envejecimiento, a una mayor susceptibilidad al daño neuronal y a una disminución de su actividad, a la atrofia neuronal y a una disminución de la capacidad de aprendizaje y memoria⁶³.

El envejecimiento cerebral está asociado a una continua disminución de la capacidad de producir ATP tanto por disminución de la cantidad de mitocondrias en sus células como por la disminución de la fosforilación oxidativa en mitocondrias disfuncionales con disminución de la transferencia de electrones por los complejos I y IV⁶⁴.

El sistema nervioso es susceptible a sufrir daño oxidativo debido a varios factores, entre los que se destacan su alto consumo de oxígeno, su dependencia en el metabolismo de carbohidratos y su compleja composición de lípidos de membrana. Los radicales libres son generados en varios sitios celulares, pero la cadena respiratoria mitocondrial es una de sus fuentes principales. En la mitocondria se producen importantes cambios moleculares y sobre ella actúa el estrés oxidativo siendo una de las teorías más sólidas que explican el envejecimiento⁶⁵.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tienen un gran impacto en los procesos de estrés oxidativo durante el envejecimiento y entre ellos se encuentran el anión superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico y el peroxinitrito. La producción de anión superóxido y de H_2O_2 aumenta en las mitocondrias de cerebro de ratones y ratas envejecidas. Se ha observado un aumento de la producción de óxido nítrico por algunos astrocitos en el cerebro envejecido y en homogenados de corteza cerebral de ratas envejecidas se ha observado una disminución de la producción de óxido nítrico en sus mitocondrias. El peroxinitrito también aumenta en el hipocampo y la corteza de ratas envejecidas⁶⁶.

La Enfermedad de Alzheimer.

La EA es un tipo de demencia progresiva que fue descrita inicialmente por el médico Alois Alzheimer en 1907^{67,68}. Se define EA como demencia progresiva que se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo, con pérdida de funciones de la memoria, de la orientación y de funciones cognitivas superiores, tales como la personalidad, generación de juicios complejos, cálculo y capacidades de relaciones visual-espacial. En las etapas terminales, pérdidas de la capacidad motora. Todo ello

implica que esta enfermedad tenga connotaciones sociales (por el número de familias afectadas con miembros que padeczan la enfermedad), familiares (por la implicación de los miembros de las familias afectadas) y biosanitarias (el gasto que supone el tratamiento de estos enfermos), hace que esta enfermedad tenga o vaya a tener una relevancia muy importante⁶⁹.

La EA afecta a grandes zonas del cerebro y su diagnóstico es fundamentalmente en estudios *postmorten*. El cerebro de EA muestra una atrofia muy clara, sobre todo en la región del hipocampo, y en las áreas de asociación de la corteza y unos ventrículos muy expandidos. Aunque se preservan regiones como las áreas visuales de la corteza, somato-sensorial y auditivas⁷⁰. Los daños más tempranos ocurren en la corteza del entorrinal, el hipocampo y en la región basal, que son las estructuras especializadas en el cerebro que desempeñan un papel crítico en la memoria⁷¹.

La neuropatología de la EA muestra dos características fundamentales que van asociadas en mayor o menor medida, Placas seniles β amiloideas (β A) extracelulares y ONF intracelulares^{72,73}.

Las placas seniles extracelulares están formadas por la polimerización de un péptido de entre 40 y 43 aminoácidos, denominado amiloide, que puede estar rodeado por células de glía reactiva y por neuritas distróficas. Los ONF intracelulares, están formados por polímeros de la proteína tau anormal o hiperfosforilada. Además, de estas marcas histopatológicas, el cerebro de EA presenta un alto nivel de gliosis reactiva (astrocitos “reactivos” y microglia “activada”), así como marcadores de inflamación y marcadores de muerte neuronal^{74,75}.

1. ¿Cuáles son las causas de la enfermedad de Alzheimer?

Si bien el 90-95% de la EA es esporádica, en un porcentaje entre 5-10% (según poblaciones) hay variantes genéticas de transmisión dominante, denominada enfermedad de Alzheimer familiar, (FAD). Así se han caracterizado tres genes mutantes FAD, presentes en los cromosomas humanos 21, 14 y 1 correspondientes a las proteínas conocidas como Proteína precursora del Amiloide (APP), Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2), respectivamente. Además, se han caracterizado una serie de variantes alélicas existentes en la población normal por tanto no mutante, de varios genes que tienen incrementada la susceptibilidad a padecer esta patología. Así se han descrito variantes de genes como Apo E, Clusterin, PICALM, etc^{76,77}.

El relativo avance en el conocimiento de la enfermedad ha venido a partir de los hallazgos tales como: por un lado la purificación y caracterización del péptido del amiloide β A 40-42 aa⁷⁸. Además ha sido más recientemente cuando se ha caracterizado la presencia de péptidos β A de 43 aa⁷⁹.

El segundo aporte importante fue la caracterización y secuenciación, de uno de los genes mutantes de una FAD ligado al cromosoma 21(CR 21)⁸⁰. De aquí se caracterizó la APP y se pudo comprobar que la secuencia del gen APP contenía la secuencia del péptido amiloide⁸¹.

2. Molécula precursora del amiloide

El estudio y caracterización de la APP puso de manifiesto que es una proteína ubicua (está presente en todas las células del organismo), y muy conservada evolutivamente. En humanos está codificado por 18 exones que pueden dar hasta ocho proteínas

diferentes, todas las variantes menos una, contendrían una región transmembrana. De todas las posibilidades, se consideran las variantes APP 695, APP 750 y APP 770 como las mayoritarias; aunque a nivel de proteínas no es fácil concretar esta afirmación por falta de anticuerpos específicos. Si bien la APP es ubicua, parece que la relación del APP 695 con respecto a 750 y 770 es mayor en neuronas⁸².

La APP tiene características de glicoproteína de membrana genérica. Presenta regiones para tres tipos de glicosilación, tipo N, tipo O y tipo proteoglicanos (asociado a la falta del exon L)⁸³, en concreto de tipo condroitina-sulfato⁸⁴. Además, dentro de las modificaciones postraduccionales, se describieron sitios de fosforilación (intra y extracelular), de tirosinas y lo más importante sitios de proteólisis, para al menos tres proteasas, descritas como secretasas α , β y γ . La secretasa α fue descrita como la proteasa que podía cortar el péptido amiloide entre las posiciones 16-17, ahora ya hay descritas y caracterizadas una serie de proteasas de la familia ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) que pueden realizar esta función, como son: ADAM9, ADAM10 y ADAM17. La secretasa Beta O (BACE), fue descrita como la proteasa que podría cortar el péptido amiloide en la posición 1 (aunque la selectividad no es perfecta, +/- 1 aa), Para esta proteasa se han descrito dos genes BACE 1 y BACE 2. La BACE 1 es codificada para un precursor de la enzima que tiene que ser activado por una proteasa activadora, del tipo furin, para producir la proteasa madura BACE1⁸⁵.

Existen dos genes responsables de la secretasa γ , el gen de la presenilinas 1 (PS1) y el gen de presenilinas 2 (PS2), los otros dos miembros de FAD descritos en poblaciones humanas. Es una proteína con ocho dominios transmembrana que constituyen el complejo “ γ -secretasa” compuesto por al menos otras tres proteínas: Nicastrina (Ncs), Aph-1 (anterior pharynx-defective-1) y Pen-2 (presenilin enhancer-2), cuya misión es

ayudar a constituir un complejo activo y favorecer la auto-proteólisis de PS1/2, para conseguir la activación de la actividad enzimática que cortara APP en la posición correspondiente para generar las posiciones 40/42 /43 del péptido amiloide⁸⁶.

3. Factores genéticos de predisposición a la enfermedad de Alzheimer

Si bien hay solo descrito tres genes mutantes responsables de las variantes FAD, hay una serie de alelos normales en la población que han sido asociados a la mayor predisposición de padecer la enfermedad de Alzheimer. La mayor probabilidad de presentar la patología son la Apolipoproteína E (Apo E), Clusterin o Apolipoproteína J (Apo J), la proteína PICALM y la proteína BIN1⁸⁷.

El primer factor descrito y mucho más estudiado que los demás es ApoE. Hay tres alelos posibles en la población humana que según la variación de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 112 y 158 se denominan: Apo E 2, Apo E 3 y Apo E 4. Cuando en la posición de los aminoácidos (aa 112 aa 158) se encuentra Alelo Cisteina-Cisteina (Apo E 2), Cisteina-Arginina (Apo E 3) Arginina-Arginina (Apo E 4). Se sabe que tener dos alelos Apo E 4, o en algunas poblaciones tener una combinación Apo E 3/Apo E 4, da una mayor predisposición a padecer la enfermedad⁸⁷.

Clusterin o Apo J es una proteína en cierta medida análoga, producida por astrositos y como la Apo E está implicada en el transporte de colesterol. Si bien las neuronas tienen la capacidad de sintetizar el colesterol independientemente del aporte de la circulación sanguínea. Sobre PICALM y BIN1 hay menos información y se sabe que son proteínas que tienen una función en la endocitosis mediada por receptor y probablemente su disfunción afecte el tráfico sináptico y/o axonal⁸⁸.

4. Teoría amiloidogénica

Las causas del Alzheimer no están esclarecidas por completo. Dentro de la multitud de hipótesis que han surgido a lo largo de los años, tal vez la teoría amiloidogénica es la que tiene mayor difusión. Si bien otras teorías como un déficit colinérgico o un fallo metabólico también han sido propuestas. La más antigua de ellas, y en la que se basan la mayoría de los tratamientos disponibles en el presente, es la hipótesis colinérgica, la cual sugiere que gran parte del deterioro en EA se debe a una reducción en la síntesis del neurotransmisor: acetilcolina. Esta hipótesis no se ha mantenido como hipótesis general ya que los medicamentos que tratan una deficiencia colinérgica tienen reducida efectividad en los estadios iniciales.

La hipótesis más extendida propone que la acumulación del péptido amiloide es iniciador de la patología, si bien una redefinición más moderna de esta teoría dice que la posterior disfunción neuronal sería a través de la fosforilación y acumulación de tau, ya que esta acumulación de polímeros de tau correlacionaría mejor con la severidad de la demencia. Esta hipótesis fue inicialmente propuesta por Prof. J Hardy en 1991, y posteriores artículos y datos fueron apoyando esta hipótesis^{89, 90}.

La hipótesis se basa en los datos del análisis y la caracterización molecular de las mutaciones aparecidas como FAD. Tanto la mutación en la proteína precursora del amiloide como las mutaciones en presenilinas parecen correlacionar con mayor capacidad para producir el péptidos amiloide ya sea β A 40, β A 42 y β A 43, o en algunos casos, mucho más β A 42. Por otro lado, la sobreexpresión de muchas de estas variantes en ratones transgénicos daba cuenta, en algunos transgénicos, de la acumulación del péptido amiloide humano y la generación de parte de la histopatología asociada a las

placas seniles, como reacción glial y muerte neuronal. Si bien estos transgénicos no presentan acumulación de tau, ni estructuras que puedan similarse a ONF, solo en algunos casos hay un incremento de fosforilación de la proteína tau⁹¹.

Este modelo incompleto de EA generó una gran discusión, por dos motivos: en primer lugar por no poder justificar, hasta años después, la falta de la segunda marca histopatológica como son los acúmulos intraneuronales ONF⁹². En segundo lugar, porque las mutaciones solo explicarían en el mejor de los casos hasta el 10% de la patología y por tanto faltaría una explicación y un mecanismo que nos justifique como generar el mismo fenotipo sin mutar APP, PS1 o PS2.

Un segundo grupo de discusión se estableció sobre cuál era el elemento tóxico. La teoría amiloidogénica propone que el péptido amiloideo no es solo un marcador de la patología, sino parte importante de su inicio. Por tanto, la definición de cómo se inicia y se acumula, y cuál es el elemento tóxico cobró una importancia grande. Los primeros datos pusieron de manifiesto que es el β A40-42 polimérico y no el β A40-42 agregado el elemento que era capaz de generar neurodegeneración y muerte, en modelos de neuronas aisladas, o en cerebros tras inyección extereotáxica.

La hipótesis más reciente propone que no es el amiloide polimérico de gran tamaño, sino más bien un oligómero de un tamaño discreto. Y desde estas observaciones se han podido establecer una serie de mecanismos de neurodegeneración que pueden ser iniciados por el péptido amiloide, en el que se han indicado desregulación de quinasas y fosfatases, toxicidad sináptica, desregulación del transporte axonal, desregulación de glutamato, modificación de la homeostasis del calcio, y/o generación de “radicales de

óxígeno reactivos” (ERO)⁹³. Además se ha demostrado un efecto adicional del péptido amiloide en la glia^{94,95}.

6. Teoría de la acumulación de Tau

La segunda estructura que define un cerebro de EA son los ONF que están compuestos por dos tipos de filamentos poliméricos: filamentos helicoidales apareados y filamentos rectos. La base de ambos es la proteína tau, como ya mencionamos. La proteína tau en estos agregados tiene una estructura polimérica y está además altamente fosforilada. Como indicamos, la acumulación y abundancia de ONF en algunas regiones del cerebro correlaciona con el grado de demencia. La reformulación de la teoría amiloidogénica se produce cuando se presentan una serie de datos en un grupo de demencias como la demencia fronto-temporal asociada al cromosoma 17 (FTDP-17) en la que se describe una mutación en la proteína tau⁹⁶. A partir de aquí se han descrito una serie de mutaciones de tau, en las que la patología conlleva demencia y acúmulos de tau del tipo ONF⁹⁷.

La generación de ratones transgénicos para las proteínas mutantes en humanos, tau y APP o tau, APP y PS1 generan fenotipos en cerebro que tienen una gran semejanza con las imágenes de cerebros de Alzheimer conteniendo placas seniles y ONF⁹⁸.

Esto hace reformular la teoría amiloidogénica en la que la disfunción del APP y la subsiguiente modificación y disfunción de tau tienen una cierta continuidad. Si bien la teoría amiloidogénica tiene una base experimental amplia, algunos de sus críticos indican que esta parte no explica necesariamente como se genera la patología en una persona que no tiene alteraciones evidentes en los genes mencionados, y por tanto que sin dejar de ser una parte importante de la progresión de la patología (“obligatoria” si

hay una de las mutaciones de FAD), no explica el origen en los casos esporádicos⁹⁹. Por tanto el estudio de los factores de riesgo¹⁰⁰ y otros posibles factores metabólicos¹⁰¹ o vasculares sigue manteniendo un gran interés^{102,103}.

Desde el principio, la presencia de tau hiperfosforilado en los ONF generó un interés importante en analizar las quinasas y fosfatasas responsables de su modulación. Como hemos indicado ONF están compuestos fundamentalmente por polímeros de la proteína tau, que es además una proteína casi exclusivamente neuronal lo cual hace de ella una diana muy relevante en neurodegeneración.

Además, se han descrito mutaciones en tau en un grupo concreto de demencias. De hecho en algunos de los primeros experimentos que correlacionaron el péptido amiloide con muerte neuronal permitió establecer un modelo celular en el que la desregulación de elementos de muerte se podían analizar de forma muy controlada y así se publicó que la adición de péptidos β A1-40 o β A 1-42 polimerizado¹⁰⁴, o en forma de oligómeros genera una hiperfosforilación de la proteína tau en neuronas primarias de hipocampo o de neuronas primarias de corteza de cerebro.

Esto permitió analizar y establecer una serie de elementos desregulados en el proceso de muerte mediado por amiloide. Se describieron una serie de quinasas entre las que destaca la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Esta quinasa inicialmente descrita como moduladora del metabolismo del glucógeno, posee un papel central en la modulación de factores de crecimiento como EGF, FGF, o neurotrofinas como NGF o BDNF^{105,106}. Además, GSK3 se acumula en ovillos, que interacciona con PS1 y es parte de la neurotoxicidad mediada por amiloide¹⁰⁷. En modelos transgénicos murinos con sobre

expresión de GSK3 genera degeneración y muerte neuronal, en correlación con un alto nivel de fosforilación de tau¹⁰⁵.

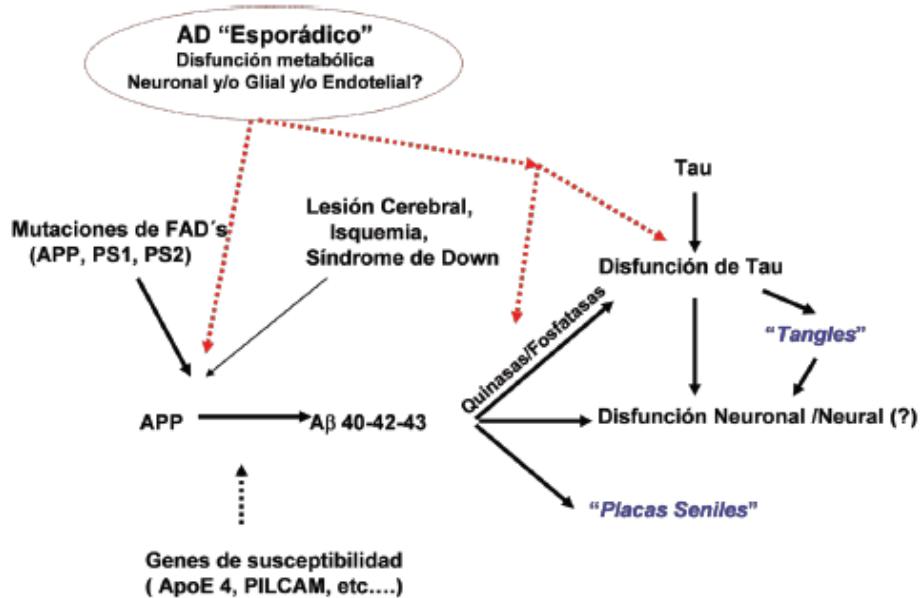


Figura 1: Representación esquemática de la hipótesis amiloidogénica y algunas de las posibles formas de asociar las modificaciones que se podrían iniciar en la "patología esporádica".

Analisis análogos han permitido establecer una serie de elementos que además de GSK3 podrían ser responsables de la muerte neuronal mediada por amiloide (MARK, quininas de estrés como JNK)¹⁰⁸ y ha abierto la puerta para definir un grupo de dianas terapéuticas nuevas que podrían dar opción de buscar y generar nuevos fármacos contra esta patología.

El estudio más exhaustivo de los pacientes "esporádicos" será fundamental para entender mejor la base de la patología en esta población que es casi el 90%, para así poder proponer una hipótesis nueva o complementaria a la teoría amiloidogénica¹⁰⁹.

El otro gran desafío que presenta EA es la obtención de un set amplio de biomarcadores que permitan generar un diagnóstico fiable en etapas tempranas. Cuanto más temprana sea este diagnóstico, las pruebas clínicas de fases III que se tiene que realizar en pacientes, serán más fiables y más fácil de interpretar¹¹⁰.

Modelos experimentales.

Para el estudio de la EA se han desarrollado diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Desde 1902 se han utilizado roedores como modelo de estudio para la EA, que van desde análisis genético hasta ratones transgénicos y “knock out”. El motivo del uso de roedores para el estudio de enfermedades neurodegenerativas se basa, principalmente, en el hecho de que cuando se llevan a cabo alineamientos múltiples de secuencia, tanto de rata como de ratón, éstos comparten un 97% de homología entre secuencias menores a 100 kilobases¹¹¹. Esta homología los hace un buen modelo para estudiar la etiología de este tipo de enfermedades en el humano. Los ratones son la especie más común utilizada por su disponibilidad, dimensión, bajo costo, fácil manejo y tasa rápida de reproducción¹¹².

El estudiar la enfermedad de Alzheimer ha sido difícil en ratones debido a que estos no presentan realmente una patología parecida a la del ser humano. Aunado a lo anterior, la dieta y los factores ambientales son también diferentes en las dos especies¹¹³. Otro factor que resulta importante es el tiempo de vida, lo roedores (rata y ratón) no duran más de dos años y la enfermedad de Alzheimer requiere de tiempo para que se desarrolle.

El uso de ratones transgénicos han sido una herramienta indispensable para lograr entender ciertos mecanismos de enfermedades y sobretodo de expresión de genes¹¹⁴. Sin

embargo, debemos tener modelos para estudiar la enfermedad que nos permitan en un periodo corto (meses), entender los mecanismos que podrían desencadenar la enfermedad.

Neuroprotección

La neuroprotección es una estrategia terapéutica y profiláctica que previene la pérdida neuronal que ocurre en enfermedades del SNC ante diferentes situaciones patológicas¹¹⁵. Aunque inicialmente el término neuroprotección solo definía la protección de las neuronas, hoy se conoce que para garantizar la integridad del tejido nervioso, las estrategias de neuroprotección tienen que abarcar a todos los tipos celulares del cerebro, lo cual incluye microglias, astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales¹¹⁶.

En la EA se activan mecanismos endógenos protectores. Estos resultados inducen al planteamiento de un enfoque terapéutico alternativo para la protección neuronal que considera la respuesta endógena del cerebro como una opción prometedora. La administración de algunos genes o de las proteínas que codifican y de factores neurotróficos como la EPO han permitido la obtención de resultados interesantes en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas e isquemia que se relacionan con la inhibición de la apoptosis neural inducida por las mismas¹¹⁷.

Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína ácida de 30kDa que se produce fundamentalmente en el riñón por las células intersticiales peritubulares y regula la eritropoyesis¹¹⁸. Inhibe la muerte celular programada en células eritroides, regula la

proliferación y diferenciación de las células precursoras eritroides, permite la maduración de eritrocitos y está involucrada en el proceso de formación de otras células hematopoyéticas. En dependencia de la composición de carbohidratos la EPO se presenta en la naturaleza en isoformas (o glicoformas) diferentes. Sus cadenas de oligosacáridos presentan una composición de carbohidratos diferentes, con excepción del ácido siálico que constituye el residuo terminal de ambos y cuya carga negativa le confiere las características ácidas a la molécula¹¹⁹.

El hígado es el órgano principal en la producción extrarenal de EPO¹²⁰. La EPO también se expresa en los tejidos que no participan en la eritropoyesis, tales como en la placenta, el corazón y en el cerebro¹²¹.

La EPO puede interactuar con receptores específicos, principalmente el receptor de EPO (EPOR), un homodímero que pertenece a los receptores de citoquinas de clase 1, o a través de la formación de heterodímeros entre el EPOR con el receptor-β común que también puede interactuar con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleucina 3 e interleucina 5¹²². El EPOR es una glicoproteína que está presente en los precursores de eritrocitos, en megacariocitos y células endoteliales; así como en células de la cresta neural y células madres embrionarias. Estudios han confirmado la presencia de EPOR en tejidos no hemopoyéticos como en neuronas y células de la glía del SNC¹²³, en el endotelio vascular¹²⁴, los pericitos¹²⁵ y el miocardio¹²⁶.

La EPO producida en el cerebro es una molécula más pequeña que la producida en el riñón, no llega a la circulación sanguínea y no es susceptible de ser eliminada en el hígado, por lo que la presencia de las moléculas de ácido siálico resulta innecesaria y es

más activa con bajas concentraciones de ligandos. Estas diferencias posiblemente son el resultado de una reducción en la sialilación, lo que soporta el concepto de una función paracrina de la EPO cerebral, ya que la EPO plasmática requiere una extensa sialilación para prolongar su tiempo de permanencia en la circulación¹²⁷. En estudio reciente se demostró que existe una isoforma de la EPO en el suero humano que no presenta acción eritropoyética probados en modelo murino. Además, protege las neuronas expuestas a hipoxia de la apoptosis¹²⁸

Se conoce que con el transcurso de los años se incrementan los niveles de EPO en el líquido cefalorraquídeo, desarrollándose una correlación positiva con la edad, lo que puede ser interpretado como una respuesta fisiológica de neuroprotección endógena. Se plantea que la alteración de la homeostasis de esta proteína puede jugar un papel deletéreo en diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA^{129,130}.

Los efectos citoprotectores de la EPO se establecieron en varios órganos y en particular el SNC. La EPO y el EPOR son sobreexpresados después de la lesión y la neurodegeneración neuronal, tal como en la corteza temporal y el hipocampo de los pacientes con deterioro cognitivo leve o en la EA¹³¹. Sin embargo, altas concentraciones de la EPO endógena están asociadas al incremento del riesgo de daño cerebral en los neonatos pretérmino extremos¹³².

Vías para hacer llegar moléculas al sistema nervioso central

Un elemento a tener en cuenta en el empleo de moléculas en el SNC, es la vía de administración para obtener el efecto neuroprotector. En estudios experimentales se suministra la EPOhr por vía sistémica (intraperitoneal e intravenosa); pues existen

evidencias de que la EPOhr cruza la barrera hematoencefálica y protege el cerebro dañado en la isquemia cerebral de manera efectiva.

La EPOhr aplicada por vía sistémica cruza la BHE en muy pocas cantidades para ser útil en la terapia de enfermedades del SNC, siendo necesaria la administración repetida de altas dosis lo que puede activar el proceso hematopoyético, efecto indeseable pues se elevaría el hematocrito y la actividad protrombótica, conjuntamente con el aumento resultante de la viscosidad de la sangre y todo esto conllevaría a una reducción en la eficacia de la perfusión cerebral¹³³.

La administración sistémica de NeuroEPO tiene la desventaja que ésta resultaría fácilmente degradable a nivel hepático por presentar menor cantidad de ácidos siálicos, por lo que el uso de otras vías como la nasal evitaría su paso por el hígado.

Se ha trabajado la posibilidad de explorar la ruta nasal para un transporte directo de drogas desde la nariz al encéfalo en diferentes enfermedades¹³⁴. Esto ha sido demostrado en animales y humanos logrado gracias a que la región olfatoria tiene atributos anatómicos y fisiológicos únicos que definen vías extracelular e intracelular hacia el SNC, que evaden la BHE¹³⁵.

La vía nasal se emplea desde hace varios años en la administración de fármacos para el tratamiento de enfermedades locales como congestión nasal y otras afecciones con el objetivo de lograr una terapia efectiva y no invasiva. Por la superficie que abarca, su gran vascularización y las características del epitelio, la mucosa nasal es altamente permeable, favoreciendo el efecto terapéutico al evitar el metabolismo hepático del primer paso y liberar rápidamente la sustancia activa, constituyendo una opción viable y atractiva para el suministro de macromoléculas como péptidos y proteínas¹³⁶.

Las células receptoras olfatorias son las únicas neuronas de primer orden cuyos cuerpos celulares se localizan en el epitelio. Sus procesos dendríticos están expuestos directamente al ambiente exterior en la vía nasal superior, mientras que sus axones no mielinizados, luego de penetrar la membrana basal, se proyectan a través de las perforaciones de la placa cribosa del hueso etmoides hacia los glomérulos sinápticos en el bulbo olfatorio. En la superficie luminal las membranas de las células receptoras y las sustentaculares están conectadas por complejos de unión típicos compuestos por tres regiones: la zónula ocludens (es la más cercana a la superficie apical), la zónula adherens y finalmente la mácula adherens. La primera forma una unión estrecha alrededor de la parte superior de la célula y controla la difusión de iones y moléculas neutras a través de los espacios intercelulares.

Para que un fármaco se distribuya desde la región olfatoria en la cavidad nasal hasta el LCR o el parénquima cerebral, tiene que atravesar el epitelio olfatorio, y dependiendo de la ruta seguida, también la membrana aracnoidea. En principio se pueden considerar tres rutas de transporte a través del epitelio olfatorio: la vía endocítica sustentacular, la vía extracelular y la vía axonal. En la primera ocurren procesos de endocitosis mediados por receptores, endocitosis de fase líquida o por difusión pasiva.

El transporte por la vía extracelular ocurre a través de las uniones estrechas o de hendiduras abiertas en la membrana entre las células sustentaculares y las neuronas olfatorias. Por la vía axonal, el fármaco puede ser transportado a través de las neuronas olfatorias (donde entra por mecanismos endocíticos o pinocíticos) hacia el bulbo olfatorio, mediante transporte axonal intracelular¹³⁷.

La administración IN puede ser utilizada para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico ante distintos daños agudos o crónicos del cerebro. Esta vía de administración podría ser mucho más segura y 10 veces más rápida que la vía endovenosa, utilizada para hacer llegar fármacos al cerebro dañado⁴⁰. Además, en modelos de isquemia y en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas, se ha demostrado la eficacia de la NeuroEPO administrada por vía IN³⁹. Por tanto, la vía IN constituye hoy una de las alternativas más prominentes para hacer llegar drogas al SNC para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA¹³⁸.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para el modelo agudo de enfermedad de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido βA_{25-35}

Se usaron ratones suizos machos, 6 semanas de edad y un peso de 31 ± 2 g, los mismos fueron adquiridos de Saint Doulchard (Francia). Los ratones se mantuvieron en una sala del bioterio de la Universidad de Montpellier. Los animales fueron distribuidos en siete grupos de diez animales cada uno de la siguiente manera:

1. Grupo control que se trajeron con solución vehículo por vía nasal.
2. Grupo control que se trajeron con Neuro-EPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ por vía nasal.
3. Grupo control que se trajeron con Neuro-EPO 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ por vía nasal.
4. Grupo EA que se trajeron con solución vehículo por vía nasal.
5. Grupo EA que se trajeron con Neuro-EPO 62,5 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ por vía nasal.
6. Grupo EA que se trajeron con Neuro-EPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ por vía nasal.
7. Grupo EA que se trajeron con Neuro-EPO 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ por vía nasal.

Para el modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer en ratones Tg2576

Se usaron ratones Tg2576 que sobreexpresa APPswe, y ratones C57BL / 6 SJL tipo salvaje controles, adquiridos de Taconic (Lelystad, Países Bajos). Se recibieron animales de 2 meses de edad que fueron alojados en el bioterio de la Universidad de

Montpellier hasta su envejecimiento. Los animales fueron distribuidos en seis grupos de diez animales cada uno de la siguiente manera:

1. Grupo control que se trajeron con solución vehículo por vía nasal.
2. Grupo control que se trajeron con Neuro-EPO 125 µg /Kg por vía nasal.
3. Grupo control que se trajeron con Neuro-EPO 250 µg /Kg por vía nasal.
4. Grupo EA que se trajeron con solución vehículo por vía nasal.
5. Grupo EA que se trajeron con Neuro-EPO 125 µg /Kg por vía nasal.
6. Grupo EA que se trajeron con Neuro-EPO 250 µg /Kg por vía nasal.

Todos los animales se mantuvieron con acceso libre al agua y los alimentos. En una instalación con temperatura y humedad controlada en un ciclo 12 horas luz-oscuridad (luces a las 07:00 h). Los experimentos conductuales se llevaron a cabo entre las 9:00 y las 17:00 horas, en un cuarto de experimentación con sonido atenuado y aire regulado, a la que se habituaron los ratones durante 30 min. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de la Directiva de la Unión Europea de 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE).

Aplicación intranasal

Se aplicó la vía intranasal (IN) como está establecido en las Guías para cuidado y uso de los animales de laboratorio¹³⁹, se sujetó el animal y se colocó en decúbito supino. Con una pipeta automática se aplicaron las dosis de cada protocolo en cada fosa nasal de forma lenta esperando que cada gota fuera adsorbida lentamente por los animales, el tiempo de aplicación fue de 1 a 2 min.

Administración de medicamentos e inyecciones

Para el modelo agudo de enfermedad de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido β A₂₅₋₃₅

Los ratones fueron tratados por vía intracerebroventricular (ICV), ya sea con el péptido amiloide β A₂₅₋₃₅ (9 nmol/ratón), o con el vehículo utilizándose como control, de acuerdo con el método descrito previamente por Maurice T y col en 1996¹⁴⁰. El péptido procedía de Genepep (Francia). La preparación homogénea del péptido oligomérico β A₂₅₋₃₅ se realizó mediante la incubación de la solución de péptido durante 4 días a 37 °C. El péptido se administró vía intracerebroventricular (ICV) en un volumen final de 3 μ l/ratón (concentración final 3 mM).

Diseño experimental

La inyección del péptido β A₂₅₋₃₅ se realizó en el día 0. La NeuroEPO se aplicó tres veces al día (a las 08:00, 12:00 y 16:00 horas) en los días del 1 al 4 después de la inyección del péptido. La NeuroEPO fue administrada a razón de 62, 125, 250 μ g /Kg por vía IN. Los grupos controles incluían a los animales tratados con vehículo por la vía intranasal (IN) y con las dosis de NeuroEPO similares a las descritas anteriormente.

Las pruebas conductuales se les realizaron a los animales a partir del día siete. Una primera serie de los animales se ensayó en la prueba de alternancia espontánea (evaluación de memoria a corto plazo) en el día siete después de la inyección del péptido y la prueba de evitación pasiva (evaluación de la memoria a largo plazo) en los días 8-9. Una segunda serie de animales se realizaron pruebas para determinar el aprendizaje en el laberinto de agua en los días del 7 al 12 después de la inyección del

péptido y luego en la prueba de reconocimiento de nuevos objetos (evaluación de elementos cognitivos) en los días del 13 al 15. Una tercera serie de los animales fue sacrificada en el día siete después de los análisis de inyección del péptido para la disección del hipocampo, la medición de la peroxidación lipídica y análisis por Western/ blot. Una cuarta serie de los animales fue sacrificada en el día siete después de la inyección del péptido mediante perfusión transcardíaca con solución de paraformaldehído para realizar estudios histológicos e histoquímica como se muestra en la figura 2.

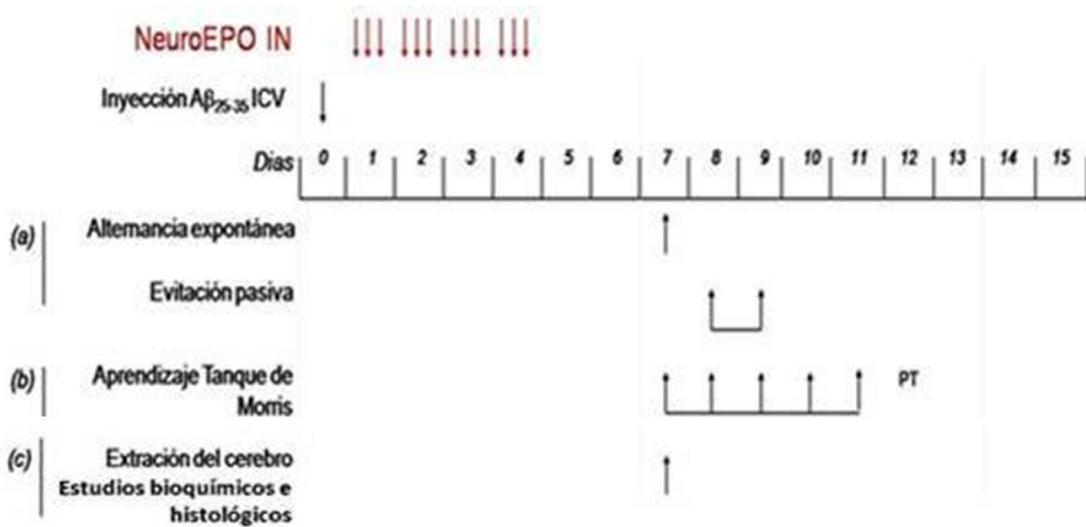


Figura 2. Esquema de tratamiento para modelo de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido amiloide βA_{25-35} . La inyección del péptido se realizó en el día 0. La aplicación de NeuroEPO IN se realizó tres veces al día entre el primero y cuarto días. A partir del séptimo día se realizan las pruebas conductuales de alternancia espontánea, la evitación pasiva los días 8 y 9, el aprendizaje en el tanque de Morris durante 5 días y al día siguiente la prueba de nado sin la plataforma además la extracción de los cerebros para estudios bioquímicos, histológicos e histoquímicos.

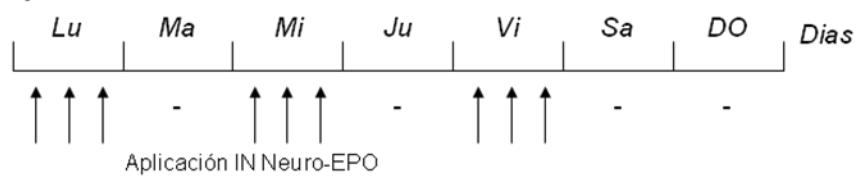
Las drogas y series experimentales

Para el modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer en ratones Tg2576

La NeuroEPO se aplicó por vía IN tres veces al día (a las 08:00, 12:00 y 16:00 horas) tres días a la semana, lunes, miércoles y viernes como se resumen en la Figura 3. El tratamiento duró 2 meses, los animales eran de 12 meses de edad en el inicio del tratamiento (Figura 3a). Los animales de los grupos controles recibieron tampón fosfato como vehículo por vía IN y la NeuroEPO se administró a dosis de 125 y 250 µg / Kg por vía IN. A los grupos de animales transgénicos se les aplicó el vehículo y la NeuroEPO de manera similar.

Los animales fueron examinados en la prueba de alternancia espontánea después de un mes de tratamiento y después de dos meses de tratamiento. Posteriormente fueron sometidos, a otros procedimientos de comportamiento como el aprendizaje en el laberinto de agua y el reconocimiento de nuevos objetos. Al final de las sesiones de conducta, los animales fueron sacrificados y se diseccionó su hipocampo y su corteza frontal en hielo para los análisis bioquímicos y otro grupo de animales fueron perfundidos por vía transcardiaca con paraformaldehído para estudios histológicos e inmunohistoquímica.

Esquema de tratamiento semanal :



Protocolo Experimental:

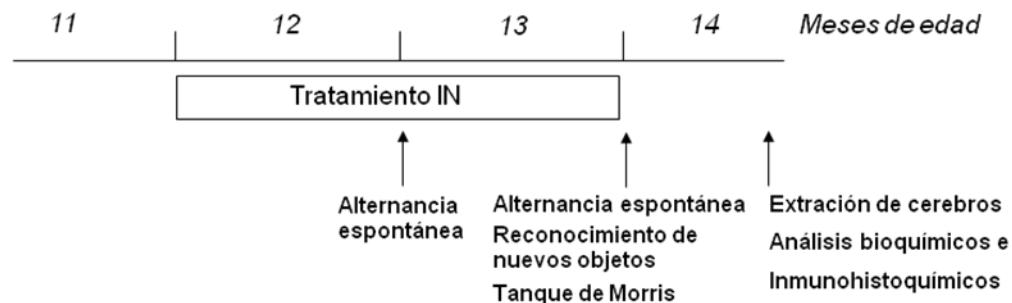


Figura 3. Esquema del modelo de animales transgénicos, aplicación del tratamiento con NeuroEPO a las dosis 125 y 250 µg / Kg por vía IN, tres veces al día, tres veces a la semana. Se comenzó tratamiento a los 12 meses de edad, durante dos meses realizándose las pruebas conductuales el primer mes y al finalizar el tratamiento prueba del laberinto en Y (PLY), entrenamiento y prueba en el tanque de Morris (PTM) además reconocimiento de nuevos objetos (RNO). Luego se sacrificaron para extraer los cerebros para estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos.

Pruebas conductuales

Alternancia espontánea en el laberinto Y (Evaluación de memoria de trabajo espacial)

Se realizaron a los animales las pruebas de rendimiento de la alternancia espontánea en el laberinto, un índice de memoria de trabajo espacial. El laberinto está hecho de cloruro de polivinilo (PVC) gris. Los brazos se identifican como A, B y C. Cada brazo es de 40 cm de largo, 13 cm de alto, 3 cm de ancho en la parte inferior, 10 cm de ancho en la parte superior, y convergieron en un ángulo igual como se muestra en la figura 4. Cada

ratón se colocó en el extremo de un brazo y le permite moverse libremente a través del laberinto durante una sesión de 8 min. La serie de entradas en los brazos, incluyendo los posibles rendimientos en el mismo brazo, se comprueba visualmente. Una alternancia se definió como entradas en los tres brazos en ocasiones consecutivas. El número de alternancias máximas es, el número total de entradas en los brazos, menos dos, y el porcentaje de alternancia se calculó según la fórmula siguiente:

Alternancias reales/ (alternancias máximas menos 2) x 100.

Parámetros incluidos el porcentaje de alternancia (índice de la memoria) y el número total de entradas en los brazos (índice de exploración).

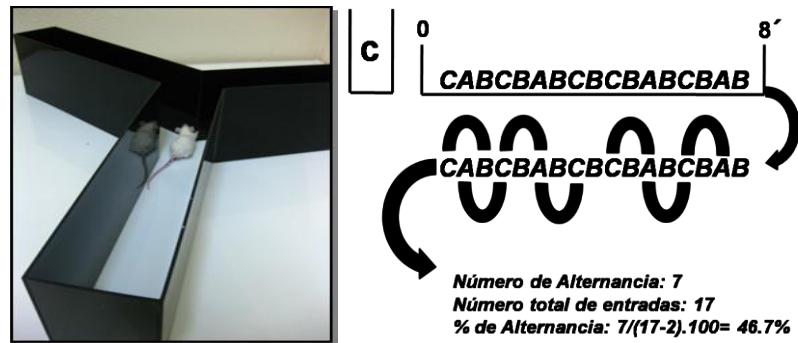


Figura 4. Laberinto de tres brazos. (Laberinto en Y) para calcular el índice de memoria de trabajo espacial

Prueba de evitación pasiva (Evaluación de memoria no espacial a largo plazo)

El aparato consiste en un compartimiento iluminado con paredes de PVC blanco (15 x 20 x 15 cm de altura), un compartimiento oscuro con paredes de PVC negro (15 x 20 x 15 cm de alto) y un suelo de rejilla. Una puerta de guillotina que separa cada compartimiento. Se encendió una lámpara de 60 W situada a 40 cm por encima del aparato en el compartimento blanco durante el período experimental. Al suelo de la rejilla se le aplicó descarga eléctrica de 0,3 mA durante 3 seg usando un codificador

generador de descargas (Lafayette Instruments, Lafayette, MA, EE. UU) como se muestra en la figura 5. La puerta de guillotina se cerró inicialmente durante la sesión de entrenamiento. Cada ratón se colocó en el compartimento blanco. Después de 5 seg, la puerta se levantó. Cuando el ratón entró en el compartimiento oscuro y colocó todas sus patas en el suelo de rejilla, se cerró la puerta con suavidad y fue aplicado la descarga eléctrica durante 3 seg. Se registraron la latencia de paso, es decir, la latencia para entrar en el compartimento oscuro, y el nivel de sensibilidad al choque. Este último se evaluó como: 0= sin señal; 1= reacciones de inmutarse; 2= reacciones de retroceder y vocalización. La prueba de retención se realizó a las 24 horas después del entrenamiento. Cada ratón se colocó de nuevo en el compartimento blanco. Después de 5 seg, la puerta se levantó. La latencia del paso a través de la puerta de guillotina se registró en un máximo de 300 seg. Los resultados se expresaron como mediana y rango intercuartílico (25 -75 %).

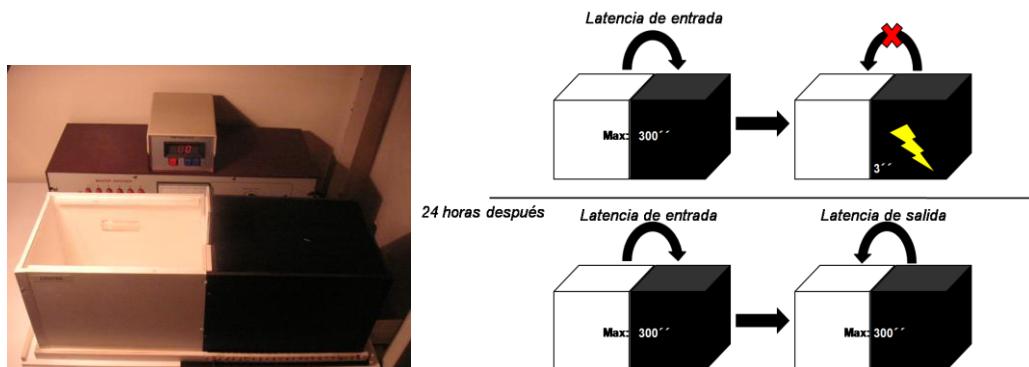


Figura 5. Equipo de prueba de evitación pasiva para evaluar la memoria no espacial a largo plazo.

Prueba de reconocimiento de nuevos objetos (evaluación de elementos cognitivos)

El aparato consistía en cuatro cuadrados de campos abiertos (50 x 50 x 50 cm de alto) realizado en plexiglás blanco y colocado en un piso equipado con diodos de emisión de luz infrarrojos (IR). La actividad locomotora de los animales y la posición de la nariz pudo ser capturado a través de una cámara sensibles a IR y analizados mediante el punto de vista de los softwares Videotrack ® y Nosetrack ®. El primer día (sesión 1), se les permitió a los animales aclimatarse durante 10 min al campo abierto. En el segundo día (sesión 2), se colocaron dos objetos idénticos (viales de plástico con tapas 50 ml) en posiciones precisas, a $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de una diagonal de la arena. Cada ratón se colocó en el campo abierto y la actividad exploratoria y la posición de la nariz se registró durante 10 min. La actividad se analiza en términos de número de contacto con los objetos y la duración de los contactos. En el tercer día (sesión 3), el objeto en la posición 2 fue sustituida por un nuevo objeto (un plástico de protección de pies de silla suave) que difieren en forma, color y la textura del objeto familiar como se muestra en la figura 6. Cada ratón se colocó de nuevo en el campo abierto y la actividad exploratoria se registró durante 10 min. La actividad se analizó de manera similar. El índice de exploración preferencial se calculó como la relación del número (o duración) de contactos con el objeto en la posición 2 sobre el número total (o duración) de los contactos con los dos objetos. Los animales que presentaron menos de 10 contactos con los objetos durante las sesiones de 2 o 3 se desechan de los cálculos.



Figura 6. Equipo de prueba de reconocimiento de nuevos objetos para evaluar elementos cognitivos.

Aprendizaje en el laberinto de agua (Evaluación de la memoria de referencia espacial)

El laberinto de agua es una piscina circular (diámetro 140 cm y altura 40 cm). La temperatura del agua es de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, la intensidad de la luz, las señales externas en la habitación, y la opacidad del agua fueron reproducidas. Se sumergió bajo la superficie del agua durante el aprendizaje una plataforma antideslizante transparente de Plexiglas (diámetro 10 cm). La natación se grabó usando software Videotrack ® (Viewpoint, Champagne -au -Mont- d'Or, Francia), usado para el análisis de las trayectorias como las latencias y las distancias. El software divide la piscina en cuatro cuadros como se muestra en la figura 7.

Aprendizaje: entre los días 7 a 11 después de la inyección del péptido, la capacitación consistió en 3 nados por día durante 5 días, con 20 min de intervalo de tiempo entre los ensayos. Comenzando en las posiciones fijadas en cada límite entre los cuadros, que fueron seleccionadas al azar y cada animal se le permitió 90 seg de natación para encontrar la plataforma. La latencia de natación se midió utilizando un cronómetro. Los animales se dejan en la plataforma durante 20 seg. Los animales que no encontraron la plataforma después de haber transcurrido 90 seg se colocaron en forma manual y se

dejan durante 20 seg. La latencia media se calculó para cada día de entrenamiento y expresó para el grupo experimental como media \pm DS.

Retención: 24 horas después de la última sesión de aprendizaje se realizó una prueba de exploración, en el día 12. La plataforma fue retirada y a cada animal se le permitió una natación libre durante 60 seg. La posición de inicio para cada ratón se corresponde con una de las dos posiciones alejadas de la localización de la plataforma (cuadro I y III). El nado en la piscina se grabó usando software Videotrack ®, se analizó el tiempo de permanencia en el cuadro de entrenamiento (T).

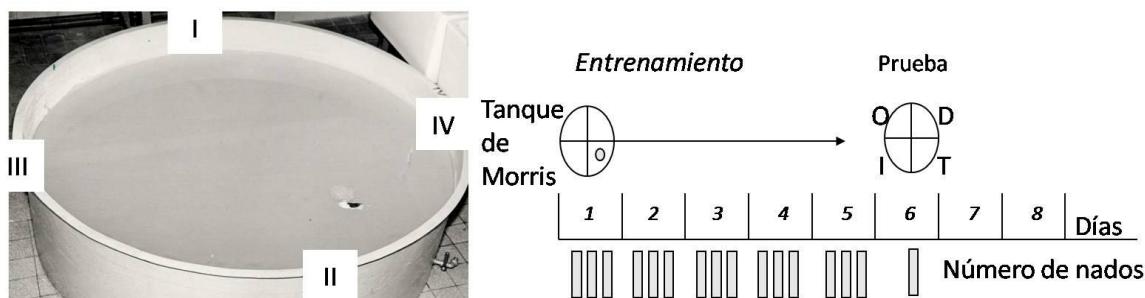


Figura 7. Equipo de prueba de aprendizaje en el laberinto de agua para evaluar la memoria de referencia espacial.

Estudios bioquímicos

Medidas de peroxidación lipídica

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y luego decapitación por guillotina el séptimo día después de la inyección del péptido β A₂₅₋₃₅. Los cerebros se retiraron rápidamente, el hipocampo fue diseccionado, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 ° C hasta que se realizó el análisis. Después de la descongelación, el hipocampo se homogenizó en metanol frío (1/10 w / v), se centrifugó a 1000 g durante 5 min y al sobrenadante recogido se le añadió una solución que contiene 1 mM de FeSO₄, H₂SO₄ 0,25 M, xilenol naranja a 1 mM y se incubaron

durante 30 min a 37 ° C. Se midió la absorbancia a 580 nm (A5801), 10 μ L de hidroperóxido de cumeno (CHP) a 1 mM se añadió a la muestra y se incubó durante 30 min a 37 ° C, para determinar el nivel de oxidación máxima. Se midió la absorbancia a 580 nm (A5802). El nivel de peroxidación lipídica se determinó como equivalentes de cogeneración de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{eq CHP} = \text{A5801}/\text{A5802} \times [\text{CHP (nmol)}] \times \text{dilución}$$

Calculado como eq CHP por peso de tejido húmedo y se presenta como porcentaje del valor del grupo de control.

Análisis por Western blot

Para la determinación de Bax, fosfo-Akt (pAkt), Akt, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y luego decapitación por guillotina el séptimo día después de la inyección del péptido β A₂₅₋₃₅. El hipocampo se obtuvo en placa de vidrio enfriada con hielo y se almacenó a -80 ° C. Los tejidos del hipocampo se homogeneizaron en tampón de extracción enfriado con hielo que contenía dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% y los inhibidores de la proteasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los homogeneizados se calentaron a 70 ° C durante 10 min y se centrifugó a 14 000 g durante 30 min a 4 ° C. La concentración de proteína se determinó utilizando el kit BCA Pierce (Pierce Biotecnología, Rockford, IL, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. Cantidad iguales de proteína, 40 μ g, se corrieron en una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12 %, a continuación, se transfirieron con la aplicación de un campo eléctrico a una membrana de transferencia de nitrocelulosa (0,45 mm, Schleicher & Schuell). Las membranas se bloquearon a continuación durante 30 min a temperatura ambiente con 5 % de leche desnatada en solución salina tamponada con

Tris 20 mM, pH 7,6, que contiene 0,1 % de Tween 20. Las membranas se incubaron a 4 ° C durante la noche con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-Bax a una dilución 1:2000, (2772, Sigma, EE. UU.), ratón anti-pAkt a una dilución 1:2000 (4060P), o de ratón anti-Akt a una dilución 1:2000 (9272, Sigma, EE. UU.), se lavó, durante 30 min en Tris salino tamponado (TBS) (50 mM Tris-NaCl 150 mM, pH 7,5) y luego se incubaron durante 2 h con un anticuerpo de cabra anti-ratón o anti-anticuerpo secundario de conejo a una dilución 1:2000 cada uno de la firma Sigma-Aldrich. La actividad de la peroxidasa se reveló mediante el uso de reactivo de quimioluminiscencia mejorada (Millipore), cuantificándose mediante un sistema de imágenes de Li-CorOdysseyFc (Li-Cor, Lincoln, NE, EE. UU.). Los resultados se normalizaron con respecto a los valores de control de la anti β -tubulina (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:5000 y se presentan como porcentaje del valor del grupo de control.

Ensayos de ELISA

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y luego decapitación por guillotina. El hipocampo y la corteza se diseccionaron en hielo, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Después de descongelar, el tejido cerebral se homogeneizó en una solución tampón TBS durante 20 seg. Después de centrifugación a 16 100 g durante 15 min a 4 ° C, se utilizaron los sobrenadantes para los ensayos de ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los kits comerciales utilizados se resumen en la Tabla 1. Para cada ensayo, la absorbancia se leyó a 450 nm y la concentración de la muestra se calculó utilizando la curva estándar. Todas las muestras se ensayaron por triplicado o duplicados. Los resultados se calcularon como pg o ng de marcador por mg de proteína y expresados como % de los datos de control tratado con vehículo.

Tabla 1. Juegos comerciales y anticuerpos usados para análisis de ELISA.

Marcador ELISA	Referencia	Suministrador
TNF α	EMTNFA	ThermoScientific Courtaboeuf
IL-1 β	E90563Mu	USCN, Wuhan, República Popular de China
GFAP	SEA068Mu	Cloud-Clone/Uscn
Iba-1	SEC288Mu	Cloud-Clone/Uscn
Bax	SEB343Mu	Cloud-Clone/Uscn
Bcl2	SEA778Mu	Cloud-Clone/Uscn
TNF α	SEA133Mu	Cloud-Clone/Uscn
FasL	SEA031Mu	Cloud-Clone/Uscn
Actividad Caspase-3	ab39401	Abcam
BA ₁₋₄₂	KHB3441	Invitrogen

Estudios histológicos

Para el modelo agudo de enfermedad de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido β A₂₅₋₃₅

Cada ratón se anestesió por inyección intramuscular (IM) de ketamina, 80 μ g / Kg y xilazina, 10 μ g / Kg y se perfundió por vía transcardiaca con 50 mL de solución salina seguido de 50 mL de paraformaldehído al 4 %. Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron durante la noche en paraformaldehido al 4 % para su fijación. Los cerebros se cortaron en secciones coronales (30 micras de espesor) usando un vibratomo (VT1000S, Leica, Alemania). Las secciones seriadas se seleccionaron para incluir la formación del hipocampo y se colocaron en portaobjetos recubiertos de gelatina.

Las secciones fueron teñidas con violeta de cresilo al 0,2 % (Sigma-Aldrich), después se deshidrataron con etanol en grado creciente, se trajeron con tolueno y se montaron con

medio DePeX (BDH laboratorios, Poole, Reino Unido). El examen de la zona CA1 se realizó en campos situados entre las coordenadas (-1,90 y -2,30) desde el bregma antero-posterior y las coordenadas laterales ($\pm 1,50$ a $\pm 1,75$) de acuerdo a lo desarrollado por Paxinos y Franklin¹⁴¹, utilizando un microscopio de luz (Dialux 22, Leitz).

Los cortes fueron digitalizados a través de una cámara CCD (Sony XC-77CE) con el NIH ImageJ ® software (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.)¹⁴², para procesar fácilmente la medición de la región de CA1 y el conteo de las células piramidales. Los datos fueron calculados como la media de 6-11 cortes por animal y 6-8 animales por grupo, y se expresaron como número de células piramidales CA1 viables por milímetro para cada grupo.

Para el modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer en ratones Tg2576

Cada ratón fue anestesiado con inyección IM de ketamina, 80 mg / kg, y xilazina, 10 mg / kg, y rápidamente fué perfundido por vía transcardiaca con 50 ml de solución salina seguido de 50 ml de paraformaldehído al 4%. Los cerebros se retiraron y se mantuvieron durante la noche en la solución de paraformaldehido al 4 % mantenido durante varios días y luego se procesaron para incluirlos en parafina. Ellos fueron cortados en secciones coronales (3 a 5 micras de espesor usando un micrótomo HISTOLINE laboratorios MR3000). Las secciones seriadas se seleccionaron para incluir la formación del hipocampo y se colocaron en portaobjeto. Los datos fueron calculados como la media de 4-6 rebanadas por animal y 3-5 animales por grupo, y se expresaron como número de células piramidales CA1 viables por milímetro para cada grupo.

Procedimiento inmunohistoquímico.

Las láminas se incubaron a 60°C durante 30 min. Posteriormente, se desparafinaron en xilol (4 x 15 min) y se rehidrataron en una serie de alcoholes a concentraciones descendentes (100, 90, 70, 50 %) hasta agua corriente. Se siguieron los procedimientos histológicos habituales. Las muestras se lavaron en agua corriente 15 min, agua destilada 10 min y TBS 5 min.

Para la evaluación de la reactividad de los anticuerpos GFAP marcador de células de la glía y 6E10 marcador de placas amiloides las muestras se pre-trataron con una solución de buffer citrato a 97°C durante 20 min. Las láminas se lavaron durante 15 min con agua corriente, 10 min con agua destilada y 5 min con TBS antes de proseguir con el procedimiento inmunohistoquímico. Para el anticuerpo Iba1 marcador de microglia no se realizó pre-tratamiento. A continuación, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena (Dako, K5207) durante 10 min y los cortes se lavaron con TBS durante 5 min.

Las muestras se incubaron con los anticuerpos durante 30 min a temperatura ambiente, acorde al diseño experimental. Como control negativo se empleó la sustitución del AcM por solución TBS. Transcurrido el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, las muestras se lavaron de forma independiente y se mantuvieron durante 5 min en TBS. Los cortes de tejidos se incubaron con el sistema de detección (Ver Tabla 2) durante 30 min a temperatura ambiente en cada uno de los pasos.

Después de la incubación con los sistemas de detección, las muestras se lavaron durante 5 min con TBS. La reacción enzimática se reveló con DAB (Dako, K3465) durante 10 min. Se monitoreó la misma bajo el microscopio óptico. El revelado de la actividad enzimática se detuvo en agua corriente y las láminas se contrastaron con Hematoxilina

de Mayer (Dako, S2020). Las muestras se dejaron secar al aire y se montaron con medio de montaje sintético CytosealTM 60 (Richard-Allan Scientific 8310-16).

Tabla 2. Sistemas de detección empleados en el estudio inmunohistoquímico.

Estudio	Sistema de detección	
	1er Paso	2do Paso
Expresión de GFAP y 6E10 en cerebro de ratón APPswe	AcP anti-Ratón/biotinilado (Dako ARK 3954, USA) Dilución 1:100	Estreptavidina/Peroxidasa (Dako K0690, USA)
Expresión de Iba1 en cerebro de ratón APPswe	Polímero/Peroxidasa (Dako E0354, Carpinteria, USA)	

Leyenda. GFAP, proteína ácida glifibrilar; 6E10, marcador de placas amiloide; Iba 1, marcador de microglías.

Análisis estadísticos

Para el modelo agudo de enfermedad de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido βA_{25-35}

Los datos se analizaron usando un análisis de varianza unidireccional o de dos vías (ANOVA, valor de F), seguido de la prueba de Dunnett. Los datos obtenidos de las pruebas de evitación o de latencias pasivas de natación no mostraron una distribución normal ya que se estableció un tiempo límite. Los datos de evitación pasiva se expresaron como mediana y rango intercuartil y fueron analizados utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal -Wallis (valores de H). Las comparaciones de grupos se realizan con pruebas no paramétricas de comparaciones múltiples de Dunn. La sensibilidad de choque también se analizó usando ANOVA no paramétrico. Los perfiles de aprendizaje en el laberinto de agua se analizaron mediante ANOVA no paramétrico repetida medida de Friedman (valor Fr), seguido de una prueba de Dunn o de U de Mann -Whitney para las comparaciones post- hoc. Los datos del tanque de

Morris se presentaron como el tiempo pasado en los cuadros. La presencia en el cuadro T se analizó utilizando una muestra de prueba de t frente al nivel de azar (15 seg). El nivel de significación estadística fue de $p < 0,05$.

Para el modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer en ratones Tg2576

Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza unidireccional o de dos vías (ANOVA, valor de F), con el genotipo y el tratamiento NeuroEPO como factores de comparación post hoc se realizaron mediante la prueba de Dunnett o una muestra prueba de t, según se especifica. La carga amiloide se analizó utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ANOVA (valor H), ya que las diferencias no eran iguales entre los grupos. Comparaciones post-hoc se realizaron utilizando una prueba de Dunn. Los perfiles de aprendizaje en el laberinto de agua se analizaron mediante ANOVA (valor Fr) medida repetida de Friedman como prueba no paramétrica, seguido de una prueba de U de Mann-Whitney para las comparaciones post-hoc de Dunn. Los datos de prueba sin la plataforma se presentaron como tiempo de permanencia en los cuadros. Presencia en el cuadro T se analizó utilizando una muestra prueba de t frente al nivel de azar (15 seg). La preferencia por los objetos, se analizó utilizando una muestra prueba de t frente al nivel de azar (50%), calculado a partir del número de contactos con los dos objetos. Todos los resultados del ANOVA están detallados en las leyendas de las figuras, para la lectura con claridad. El nivel de significación estadística fue de $p < 0,05$. Cuando el valor de ANOVA fue <1 , no alcanzó significaciones cualesquiera que sean los grados de libertad. Por lo tanto, se indica como tal ($F < 1$).

En ambos modelos se realizaron estudios a nivel molecular, celular y de organismo que se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de estudios realizados en ambos modelos.

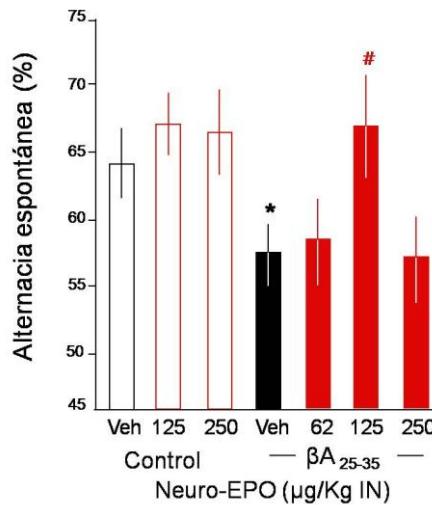
NIVEL DE ORGANIZACIÓN	EFFECTO EN LOS ANIMALES	Estudio realizado
NIVEL MOLECULAR	Estrés Oxidativo	Peroxidación de lípidos
	Neuroinflamación	TNF α , IL1 β , Iba1, GFAP
	Estrés mitocondrial	Caspasa 3
	Apoptosis	Akt, Bax, Bcl 2 y Fas L
	Niveles de β A ₁₋₄₂ soluble e insoluble	
NIVEL CELULAR	Neuroinflamación	Immunohistoquímica de microglia Iba1 y glías GFAP
	Perdida celular	Tinción de Cresil violeta
NIVEL DE ORGANISMO	Déficit de aprendizaje y memoria	Alternancia espontánea en el laberinto Y (Evaluación de memoria de trabajo espacial a corto plazo)
		Tanque de Morris (Prueba de reconocimiento espacial a largo plazo)
		Prueba de evitación pasiva (Evaluación de memoria no espacial a largo plazo)
		Reconocimiento de nuevos objetos (evaluación de elementos cognitivos)

RESULTADOS

Experimento 1: Efecto de la NeuroEPO en modelo agudo de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido amiloide β 25-35.

Alternancia espontánea en el laberinto Y (Evaluación de memoria a corto plazo)

A los animales inyectados con el péptido β A₂₅₋₃₅ que fueron tratados con NeuroEPO se les realizó la prueba de alternancia espontánea el día siete después de la inyección del péptido (Figura 8). El tratamiento con el péptido β A₂₅₋₃₅ condujo a una disminución significativa $p < 0,05$ en la alternancia espontánea con respecto a los animales controles, que fue bloqueado de manera significativa, $p < 0,05$, por la NeuroEPO en la dosis de 125 μ g / Kg. La NeuroEPO no produjo ningún efecto en los animales controles a las diferentes dosis ensayadas. $n = 16-22$ animales por grupo.



*Figura 8. Efecto de la NeuroEPO contra el déficit de aprendizaje en la alternancia espontánea inducido por β A₂₅₋₃₅ en ratones. * $p < 0,05$ animales tratados con β A₂₅₋₃₅ / vehículo contra los animales Control / vehículo. # $p < 0,05$ animales tratados con β A₂₅₋₃₅ NeuroEPO 125 μ g / Kg contra animales tratados con β A₂₅₋₃₅ / vehículo*

Prueba de evitación pasiva (Evaluación de memoria no espacial a largo plazo)

El grupo tratado con el péptido βA_{25-35} mostró una disminución significativa $p < 0,05$ en la latencia de entrada a través de la evitación pasiva, prueba de memoria no espacial a largo plazo. El tratamiento NeuroEPO previno el déficit de manera significativa $p < 0,05$ y $p < 0,01$ en todas las dosis ensayadas. La NeuroEPO no produjo ningún efecto en los animales controles a las diferentes dosis ensayadas. $n = 22-27$ animales por grupos.

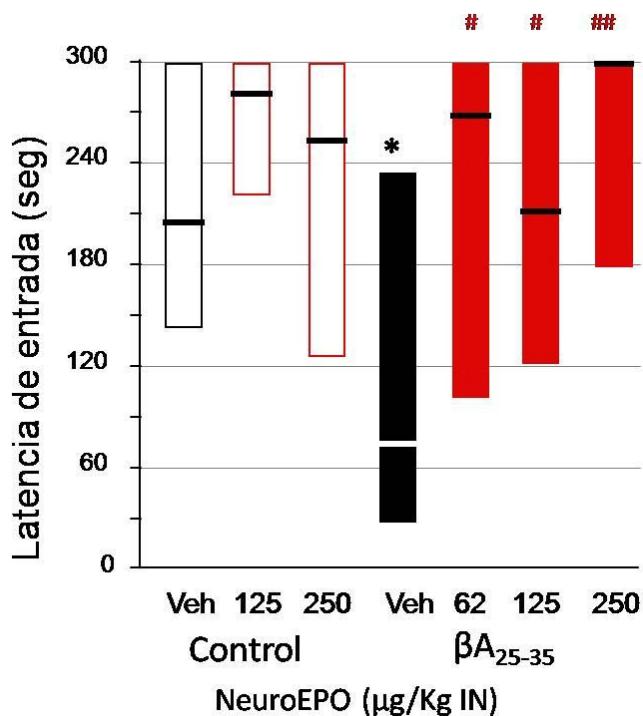


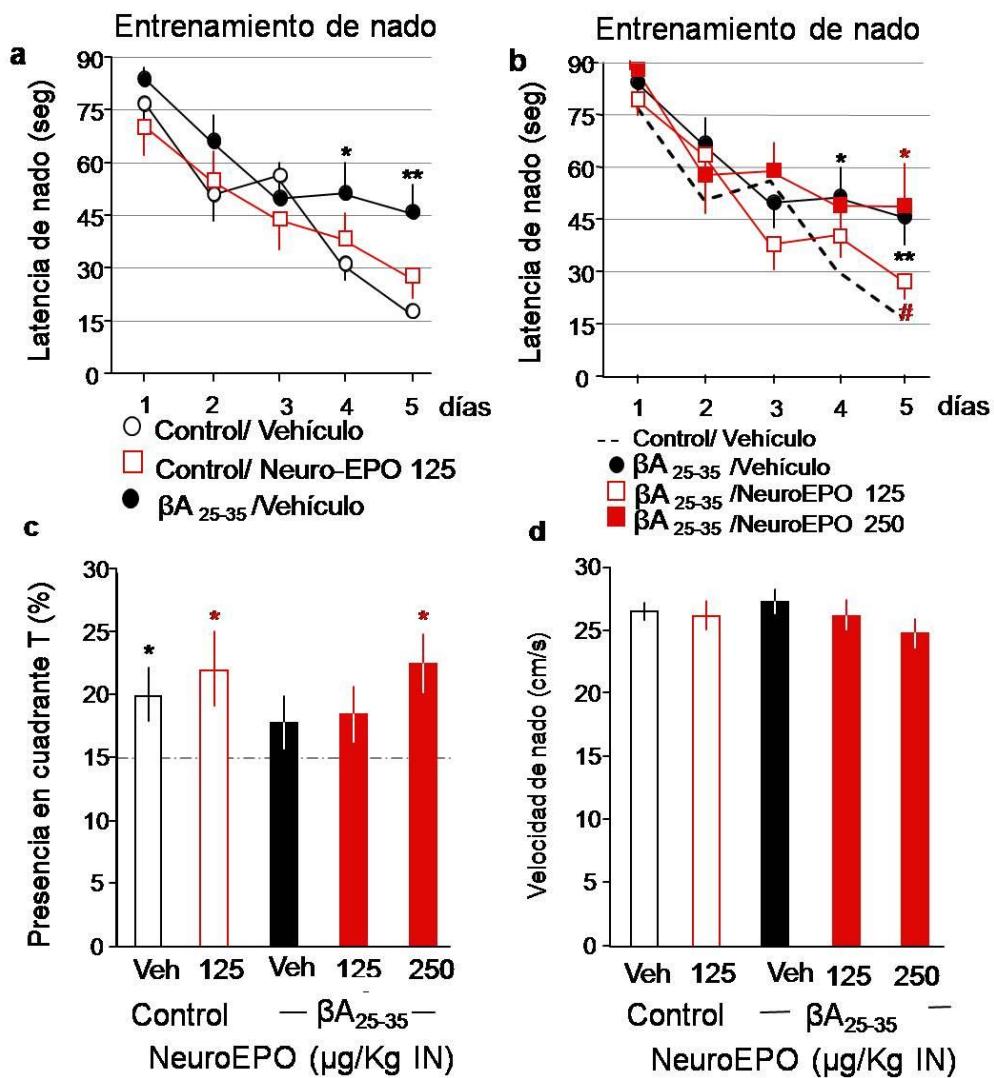
Figura 9. Efecto de la NeuroEPO contra el déficit de aprendizaje en la evitación pasiva inducido por βA_{25-35} en ratones. * $p < 0,05$ animales tratados con βA_{25-35} / vehículo, contra los animales Control / vehículo. # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ grupo βA_{25-35} / NeuroEPO 125 μ g / Kg) contra animales con βA_{25-35} / vehículo. Prueba de Dunn

Aprendizaje en el laberinto de agua (Evaluación de la memoria de referencia espacial)

Para los grupos tratados con Neuro-EPO en dosis de 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el análisis de perfiles de aprendizaje mediante el test ANOVA de Friedman mostró que las latencias en los grupos Control / vehículo, $p < 0,0001$, Control / NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, $p < 0.01$ y $\beta\text{A}_{25-35} / \text{vehículo}$, $p < 0,001$, disminuyeron significativamente durante el entrenamiento (Figura 10a). Sin embargo, los animales del grupo, $\beta\text{A}_{25-35} / \text{vehículo}$ aparecieron menos eficiente durante los últimos dos ensayos, ya que la duración de la natación, en comparación con los ratones Control / vehículo fueron significativamente mayores (Figura. 10 a). $n = 16$ animales por grupo.

El tratamiento con NeuroEPO a 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ permitió una mejora significativa del perfil de adquisición, $p < 0,0001$, $n = 20$, en comparación con los ratones tratados $\beta\text{A}_{25-35} / \text{vehículo}$, y se alcanzó significación estadística para el ensayo 5 (Figura 10b). Prueba de Dunn en (a, b).

Durante la prueba de retención, los animales de los grupos Control / vehículo y Control / NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ pasaron más tiempo en el cuadro T, lo que muestra un aprendizaje más efectivo de la posición de la plataforma (Figura 10 c). El grupo $\beta\text{A}_{25-35} / \text{vehículo}$ no logró mostrar un tiempo de presencia más alto que el nivel de azar 15 seg (Figura 10 c) al igual que el grupo con tratamiento NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, pero no así con 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ lo que atenúa el déficit (Figura 10 c). Al mismo tiempo, comprobamos que ninguno de los tratamientos altera la velocidad de natación de los animales (Figura 10 d).



*Figura 10. Efecto de la NeuroEPO contra el déficit inducido en ratones por el péptido βA_{25-35} en el aprendizaje del laberinto de agua: (a, b) los perfiles de adquisición durante el entrenamiento de nado, (c) la prueba de retención y (d) la velocidad de nado. En (b), el perfil de los animales controles Control / vehículo se indica mediante una línea de puntos. En (c), el nivel azar (15 seg) se perfila mediante línea discontinua. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ contra grupo Control / vehículo; # $p < 0,05$ contra el mismo grupo tratado con βA_{25-35} /vehículo, * $p < 0,05$ frente a nivel azar (15 seg), una muestra de Prueba de t en (c). $p > 0,05$ en (d).*

Medidas de peroxidación lipídica

Como se muestra en la Figura 11. La inyección del péptido βA_{25-35} indujo un aumento de un 86 % en la peroxidación de lípidos (Figura. 11). Estos aumentos fueron totalmente bloqueados por el tratamiento NeuroEPO, a las dosis 125 y 250 $\mu g / Kg$ $p<0,0001$, $n=10-12$ animales por grupos. El tratamiento con NeuroEPO a las dosis ensayadas no tuvo efecto en los animales controles.

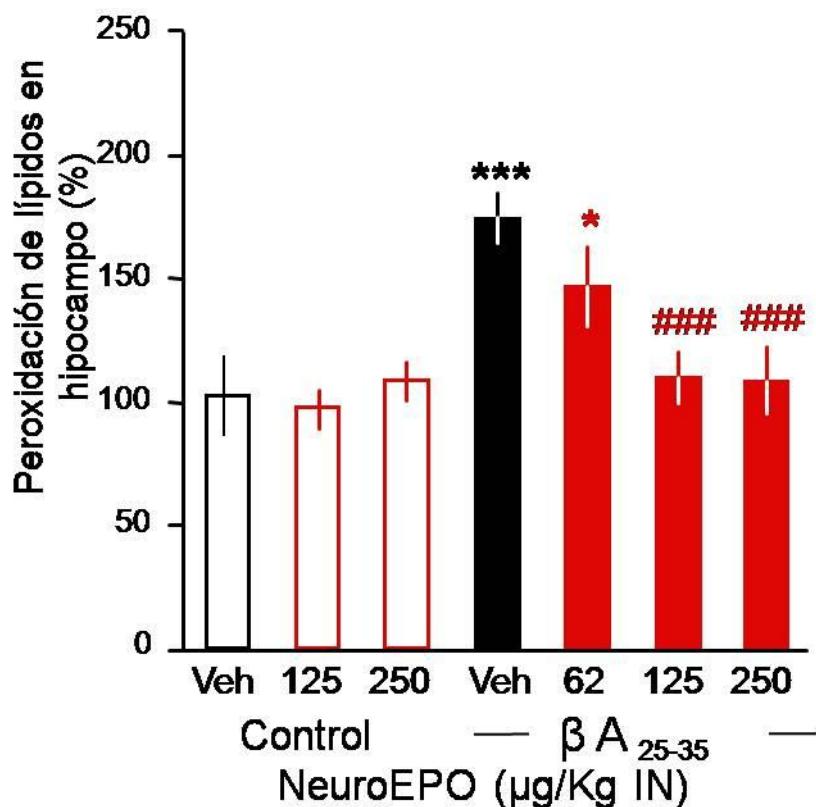


Figura 11. Efecto sobre los niveles de peroxidación lipídica en el hipocampo, 7 días después de la inyección del péptido βA_{25-35} en ratones. (***) $p <0,001$ animales tratados con (βA_{25-35} / vehículo) contra los animales (Control / vehículo). (*) $p <0,05$ y (# # #) $p < 0.0001$ animales tratados con (βA_{25-35} / NeuroEPO) contra el grupo de animales (βA_{25-35} / vehículo) Prueba de Dunnett.

Análisis por Western blot

La inducción de la apoptosis en el tejido cerebral se evaluó por un método semi-quantitativo, mediante el análisis del nivel de la proteína pro-apoptótica Bax por Western blot como se muestra en la Figura 12. La inyección del péptido βA_{25-35} indujo hasta 101 % de aumento significativo $p<0,0001$ en la relación de Bax/ β -tubulina. El tratamiento con NeuroEPO a 125 μ g / Kg disminuyó significativamente $p<0,0001$ el aumento inducido por el péptido βA_{25-35} . El tratamiento con NeuroEPO sobre el nivel de Bax no tuvo efecto en los animales controles.

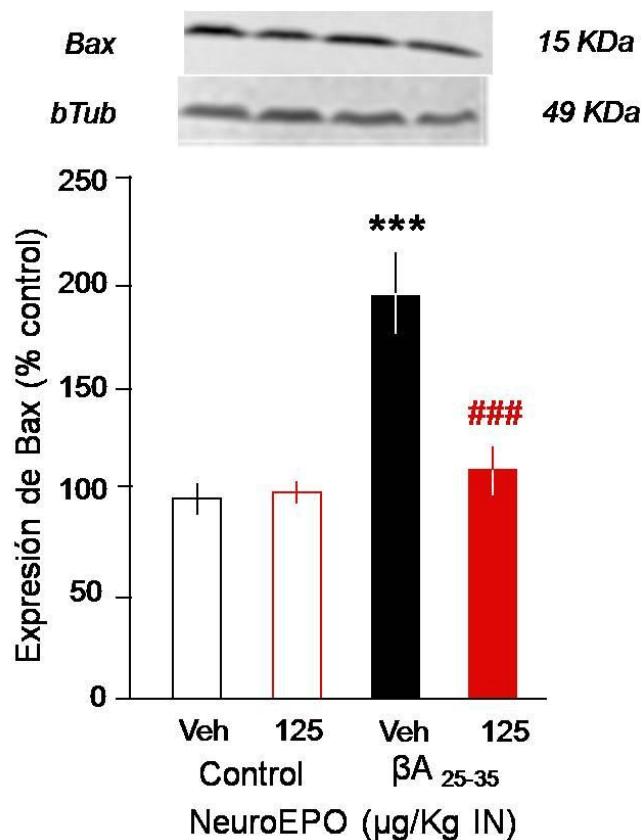


Figura 12. Efecto de NeuroEPO sobre: niveles de la expresión de Bax en el hipocampo, 7 días después de la inyección del péptido βA_{25-35} en ratones. La expresión de Bax se calculó como la relación Bax/ β -tubulina todos los datos expresados como porcentaje del control / vehículo. # # # $p < 0.0001$ contra el grupo βA_{25-35} / vehículo; Prueba de Dunnett, $n=11-12$ animales por grupos.

La activación de Akt se evaluó mediante la cuantificación de la relación entre la forma fosfoactiva (Ser473)-Akt sobre el total de Akt como se muestra en la Figura 13. El péptido βA_{25-35} indujo una disminución significativa $p<0,05$ de 55 % en la relación P (Ser473) Akt/Akt. El grupo tratado con NeuroEPO a 125 $\mu g / Kg$ impidió de manera significativa $p<0,001$ la disminución inducida por péptido βA_{25-35} en P (Ser473) Akt/Akt. El tratamiento con NeuroEPO no tuvo efecto en los animales controles. $n=11-12$ animales por grupos.

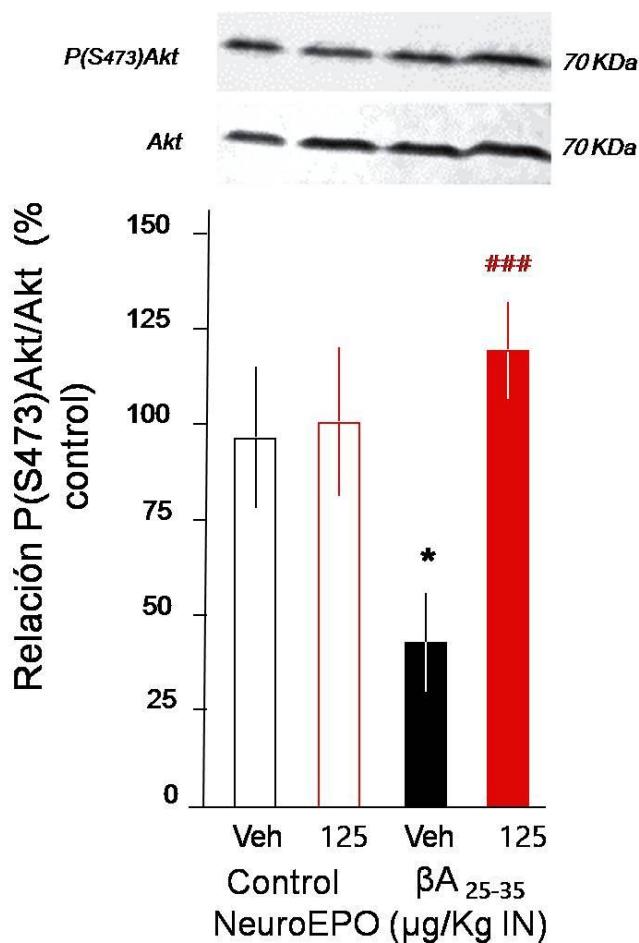


Figura 13. Efecto la NeuroEPO sobre la activación de Akt en el hipocampo, 7 días después de la inyección del péptido βA_{25-35} en ratones. * $p < 0.05$, grupo tratados con βA_{25-35} / vehículo contra grupo (Control / vehículo. # # # $p < 0,001$ grupo βA_{25-35} / NeuroEPO 125 $\mu g / Kg$ contra el grupo de animales βA_{25-35} / vehículo; Prueba de Dunnnett.

Ensayos de TNF α e IL-1 β por ELISA

El péptido βA_{25-35} indujo un aumento muy significativo $p<0,001$ en los niveles de TNF α hasta un 187 % (Figura. 14). El tratamiento con NeuroEPO 125 μ g / Kg bloqueó de manera significativa $p<0,001$, el aumento inducido por el péptido βA_{25-35} en los niveles de TNF α . El tratamiento con NeuroEPO no tuvo efecto en los animales controles. $n=11-12$ animales por grupo.

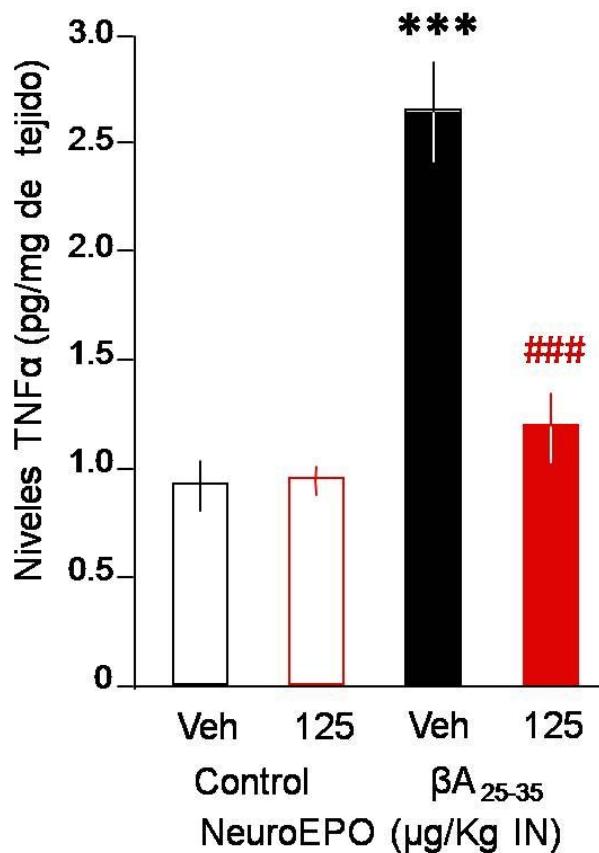


Figura 14. Efecto de la NeuroEPO sobre los niveles de TNF α en el hipocampo de ratones inyectados con el péptido βA_{25-35} . *** $p<0.001$ animales tratados con βA_{25-35} /vehículo frente al grupo Control / vehículo, # # # $p <0,001$ animales con βA_{25-35} /NeuroEPO 125 μ g / Kg contra el grupo tratado βA_{25-35} /vehículo; Prueba de Dunnett.

El péptido βA_{25-35} también indujo un aumento significativo $p<0,001$ en los niveles de IL-1 β hasta 155 %. El tratamiento con NeuroEPO 125 $\mu g / Kg$, bloqueó de manera significativa $p<0,001$ el aumento inducido por el péptido βA_{25-35} en los niveles de IL-1 β . El tratamiento con NeuroEPO no tuvo efecto en los animales controles. $n=11-12$ animales por grupos.

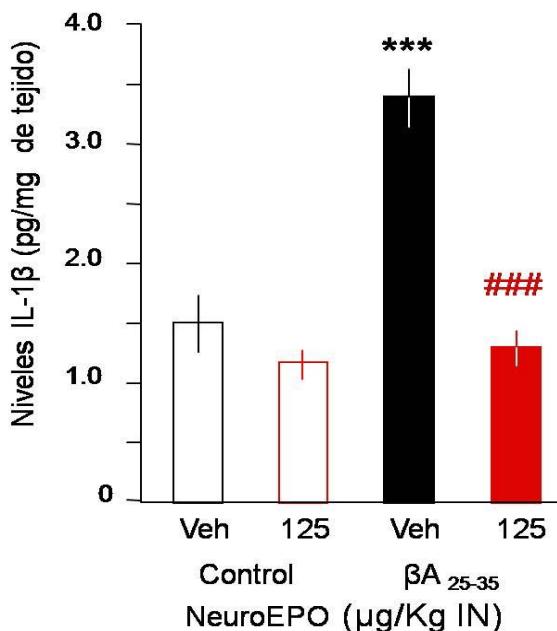
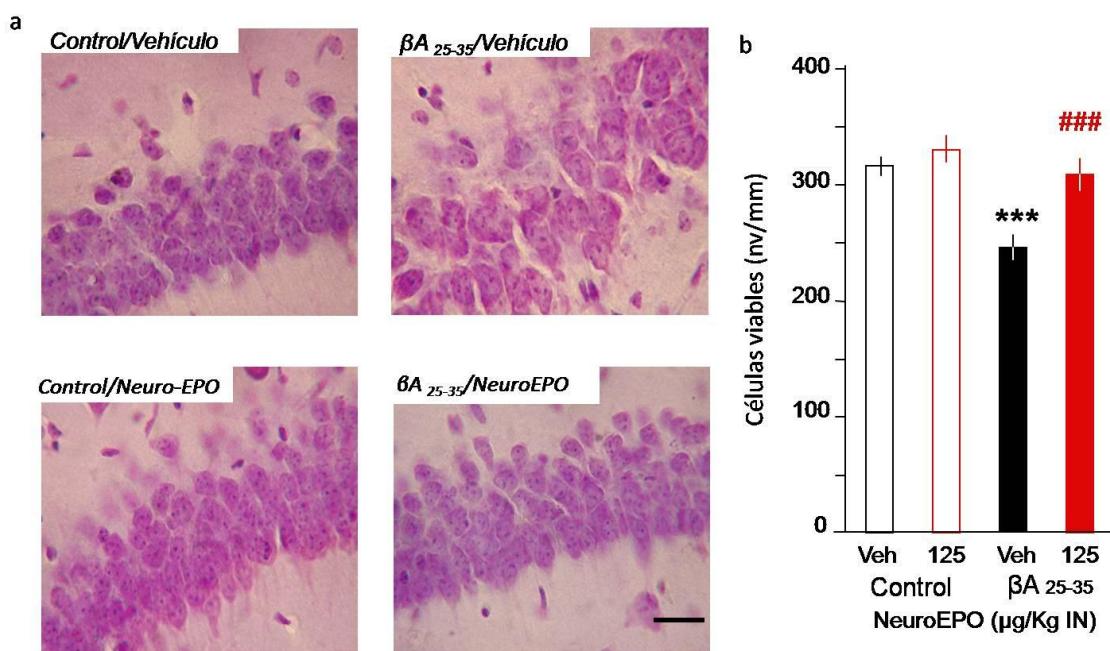


Figura 15. Efecto de la NeuroEPO en los niveles de IL-1 β en el hipocampo de ratones inyectados con el péptido βA_{25-35} . *** $p<0.001$ animales tratados con βA_{25-35} / vehículo frente al grupo tratado Control / vehículo, # ## $p <0,001$ animales tratados con βA_{25-35} / NeuroEPO 125 $\mu g / Kg$ contra el grupo tratado βA_{25-35} / vehículo; Prueba de Dunnett.

Medidas histológicas

Para evaluar el impacto de los tratamientos de EPO en la integridad de las células cerebrales, se analizaron las células viables de la capa piramidal en la región CA1 del hipocampo, mediante la coloración de violeta de cresilo. Se observó que la capa de

células piramidales adoptó un aspecto desorganizado con células tumefactas con núcleos pignóticos después de la inyección del péptido βA_{25-35} (Figura 16a); mostrando la recuperación de las células del hipocampo en los grupos controles y lesionados tratados con NeuroEPO 125 $\mu g / Kg$ similares a las células del grupo control tratado con vehículo. El tratamiento con NeuroEPO 125 $\mu g / Kg$, dio como resultado un bloqueo altamente significativo $p<0,0001$ de la pérdida de células, con un aumento en el número de células viables contadas (Figura 16 b). $n=6-8$ animales por grupo.



*Figura 16. Efecto de la NeuroEPO en la toxicidad inducida por el péptido βA_{25-35} inyectado ICV en ratones. La pérdida de células piramidales en el área CA1 de la capa de células piramidales del hipocampo, 7 días después de la inyección del péptido βA_{25-35} . Microfotografías representativas de secciones coronales del hipocampo subcampo CA1 teñido con cresil violeta. La barra de escala =50 μm . (b) Los niveles promedios de las células viables, se contaron 6-11 rebanadas por ratones y 6-8 ratones por grupo. *** $P<0.001$ frente al grupo tratado (Control / vehículo); (# # #) $P<0.001$ contra el grupo tratado (βA_{25-35} / vehículo); Prueba de Dunnett.*

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se aportan pruebas de la neuroprotección inducida por la administración de NeuroEPO por vía IN frente al déficit de memoria y la toxicidad inducida por la agregación del péptido βA_{25-35} una semana después de su inyección ICV en los cerebros de los ratones suizos machos.

En primer lugar, se analiza el déficit de aprendizaje inducidos por el péptido, y la afectación severa de varias formas de memoria. Examinando la alternancia espontánea en respuesta a la memoria de trabajo espacial, se evaluó la evitación pasiva como respuesta a una memoria no espacial a largo plazo y la evaluación de la memoria de referencia espacial.

La NeuroEPO IN fue eficaz con las dosis de 125 y 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en la mayoría de las pruebas utilizadas. Estas dosis fueron empleadas previamente en modelos de isquemia cerebral en gerbos de Mongolia para proporcionar neuroprotección¹⁴³. Los efectos directos podrían estar relacionados con la mejoría de las capacidades de aprendizaje observados después de los tratamientos NeuroEPO en los experimentos. La protección lograda en los animales tratados podría ser explicada por mecanismos que ya han sido estudiados para la EPO, aunque no podemos excluir otros más específicos.

Se ha reportado que la EPO impacta directamente en la plasticidad y la liberación sináptica de los neurotransmisores, particularmente en la región del hipocampo. Un tratamiento con EPO durante cinco días en un modelo de EA en ratas mejoró la potenciación a largo plazo, una alteración de la plasticidad sináptica a corto plazo y la transmisión sináptica, cambiando el equilibrio de la actividad excitadora e inhibidora¹⁴⁴.

Se ha reportado que en animales tratados con EPO, las redes de neuronas primarias del hipocampo desarrollaron una menor actividad global. Estos efectos resultaron en una mejoría de la memoria dependiente del hipocampo por modulación de la plasticidad, la conectividad sináptica y la actividad de las redes neuronales relacionados con la memoria¹⁴⁵.

El estrés oxidativo se evaluó mediante la medición de la peroxidación de los lípidos de membrana inducida por la inyección del péptido β A₂₅₋₃₅, en hipocampo. El tratamiento con NeuroEPO mostró un impacto positivo sobre la peroxidación de lípidos. La disminución del estrés oxidativo inducido por β A₂₅₋₃₅ con la formulación de NeuroEPO IN alcanzó valores similares a los animales controles.

Se han reportado las propiedades antioxidantes de la EPO relacionándola con su efecto citoprotector en varios modelos. En cultivo de neuronas del hipocampo de rata sometidas a hipoxia o la exposición de glutamato, la administración de EPO dio lugar a una protección significativa^{146,147}. Estudio reciente en cultivo primario de neuronas obtenidas de la corteza de embriones de ratas Wistar de 17 días. Se indujo exitotoxicidad por glutamato a 100 μ M durante 15 min. 24 h después fueron tratados con NeuroEPO 100 ng / mL, produjo una disminución significativa $p <0,01$ de la mortalidad y tendencia a reproducir las características morfológicas similares de las células control además, la disminución del estrés oxidativo¹⁴⁸

Ha sido sugerido que el mecanismo del efecto protector de la EPO contra la toxicidad del amiloide involucra el aumento de la actividad NF- κ B, la inhibición de las proteínas pro-apoptóticas, generadas por la supresión de la apoptosis TNF α , la modulación de la detención del crecimiento y de la proteína de daños en el ADN 45 (Gadd45 β) y la

activación directa de Bcl-xL¹⁴⁹. Como consecuencia, la EPO disminuye la producción de ERO, reduce el potencial de membrana mitocondrial, la relación de Bcl-2/Bax y estabiliza la activación de la caspasa-3¹⁵⁰. Esos resultados coinciden con los de este trabajo donde los tratamientos con NeuroEPO bloquean la expresión de Bax inducida por β A₂₅₋₃₅.

Para el examen de una vía eficaz de señalización sobre el impacto de la toxicidad del péptido amiloide en los sistemas de protección endógenos, se evalúan las quinasas de PI3K/Akt, desencadenada por la activación de varios tipos de receptores, incluyendo los receptores para el factor trófico, tales como BDNF, neurotransmisores tales como la acetilcolina, o EPO. La Akt se bloquea en respuesta al péptido β A₂₅₋₃₅ de una manera dependiente de PI3K¹⁵¹.

El efecto de la EPO depende de la activación de varias quinasas, incluyendo Janusquinasa 2 (JAK2), una tirosina quinasa que se asocia con el receptor de la EPO, y la proteína quinasa B/Akt. La EPO previene las lesiones de apoptosis en las células neuronales a través de la inducción de la autofosforilación de JAK2¹⁵². Además, se reporta que la EPO mejora significativamente la actividad de Akt durante el estrés oxidativo para prevenir la activación inflamatoria de la microglia^{153,154}. La actividad de Akt sobreexpresada parece ser un paso necesario en este mecanismo. Se ha reportado que a través de la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt, la EPO es capaz de regular la apoptosis celular, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo después de la hipoxia¹⁵⁵. En nuestro estudio la NeuroEPO a 125 μ g / Kg, impidió completamente la fosforilación de la AKT inducida por péptido β A₂₅₋₃₅.

También se ha reportado que la EPO promueve una protección eficaz contra patologías inflamatorias. Se observó un bloqueo por la NeuroEPO del TNF α y IL-1 β provocados por la toxicidad del β A₂₅₋₃₅. Se cree que la capacidad neuroprotectora de la EPO puede involucrar principalmente la homeostasis celular extrínseca a través de la modulación de la activación microglial y el control de la liberación de citoquinas¹⁵⁶. Las microglias activadas liberan grandes cantidades de estas citoquinas pro-inflamatorias y neurotóxicas, incluyendo TNF α y IL-1 β , radicales libres, como el óxido nítrico o iones superóxido, y los metabolitos de ácidos grasos, lo que podría contribuir de manera directa a ampliar la muerte celular por apoptosis^{157,158}. Se ha demostrado que la EPO ejerce una acción anti-inflamatoria a través de vías que implican la exposición de fosfatidilserina, la activación microglial, la actividad de Akt, y la regulación de las caspasas, o más directamente por la inhibición de varias citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, TNF α y MCP-1^{159,160}.

El uso de la tinción de violeta de cresilo permite evaluar la pérdida de células CA1, se ha demostrado que el β A₂₅₋₃₅ altera de manera significativa la viabilidad celular en la capa de células piramidales del hipocampo^{161,162}. El tratamiento con NeuroEPO, disminuye la pérdida de células piramidales de la región CA1 del hipocampo causada por el β A₂₅₋₃₅, una zona rica en neuronas glutamatérgicas altamente sensible a la excitotoxicidad.

Estos resultados describen las potencialidades de la formulación intranasal de NeuroEPO, con menos reacciones adversas que cuando se aplica la EPOhr crónicamente. Esto constituye un beneficio potencial de NeuroEPO sobre otras variantes de EPO para el tratamiento crónico de enfermedades neurodegenerativas.

No obstante, este modelo es solo una aproximación a la forma aguda de la EA producto del impacto neurotóxico de la aplicación del agregado β A₂₅₋₃₅; además permanece ausente la comorbilidad y alteraciones fisiológicas normales producidas por el proceso de envejecimiento. Por tanto, se hace necesario evaluar estos efectos de la NeuroEPO en un modelo que tenga mayor similitud al desarrollo de esta enfermedad en el humano. Como por ejemplo en el modelo transgénico de EA Tg2576 portador del gen de una familia suiza que sobreexpresa la proteína precursora de β amiloide (APPswe) comenzando el tratamiento a los 12 meses de edad, donde no estarán presentes las limitaciones señaladas en el modelo anteriormente utilizado. La ventaja del uso de la NeuroEPO IN es que no tiene actividad hematopoyética.

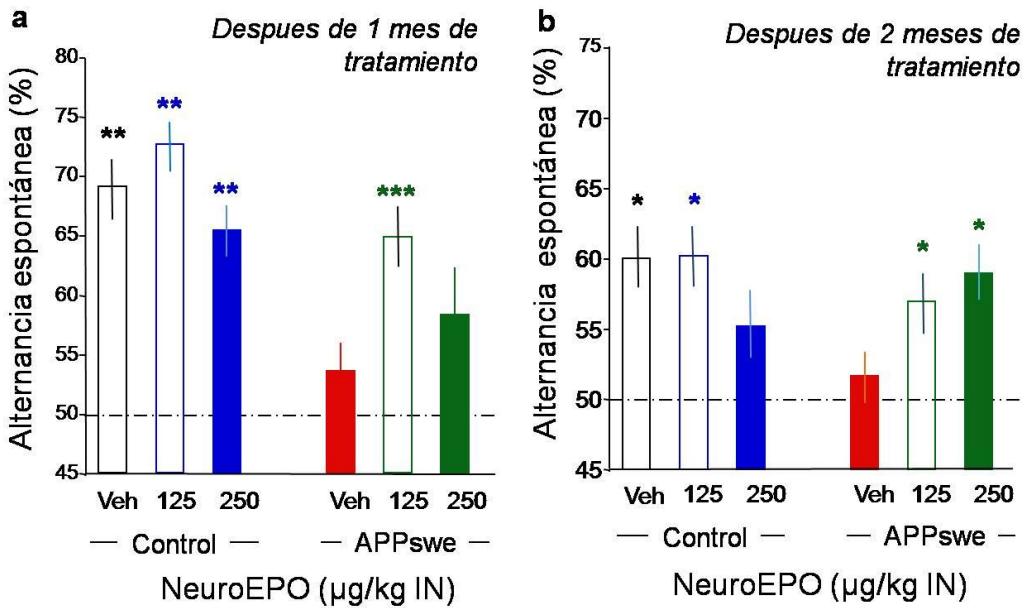
RESULTADOS

Experimento 2: Efecto neuroprotector de la NeuroEPO en modelo transgénico Tg 2576 de enfermedad de Alzheimer.

Estudio de conducta

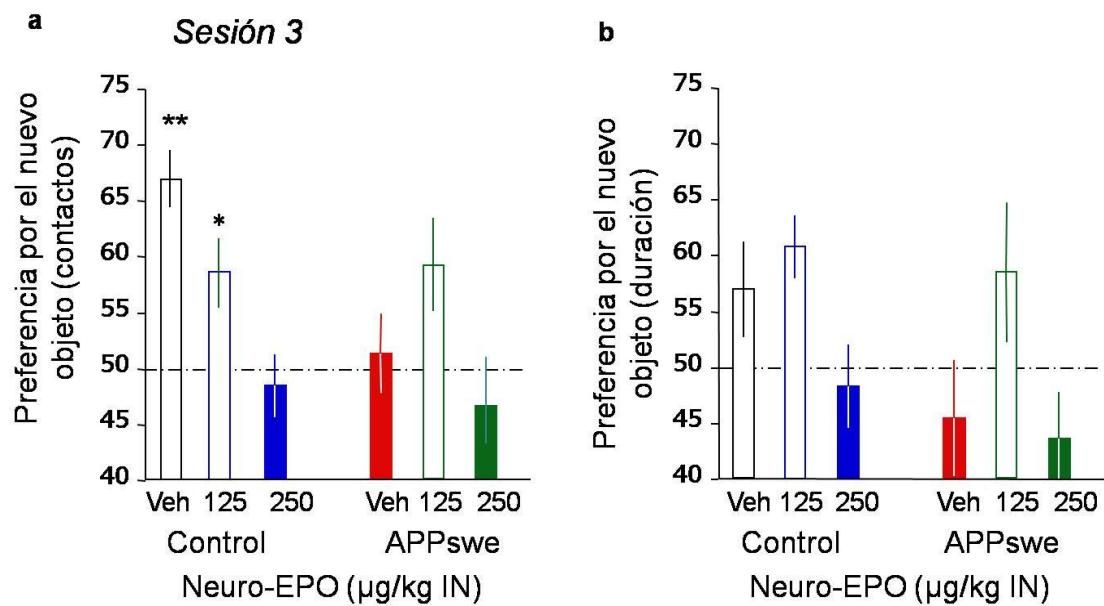
El rendimiento de la alternancia espontánea en el laberinto en Y se analizó después del primer y segundo meses de tratamiento como se muestra en la (Figura 17). Después de un mes de tratamiento con NeuroEPO, los ratones transgénicos APPswe mostraron un deterioro de la alternancia en comparación con los animales controles (Figura 17 a). El tratamiento con NeuroEPO recupera la memoria espacial a corto plazo en ratones APPswe, particularmente a dosis de 125 µg / Kg (Figura 17 a). Los animales mostraron una actividad exploratoria similar con 20-25 entradas en los brazos tanto en los animales controles como en los transgénicos con ambas dosis de NeuroEPO.

Después de dos meses de tratamiento, los animales controles mostraron una marcada disminución en la alternancia espontánea, pero permanecieron significativamente más alto que el nivel azar 50% (Figura 17 b). Los ratones APPswe mostraron un deterioro de la alternancia que fue atenuada por el tratamiento con NeuroEPO en ambas dosis (Figura 17 b). Nótese que la dosis más alta de NeuroEPO deteriora el comportamiento de alternancia en los ratones controles. Los animales mostraron un comportamiento exploratorio disminuido, con sólo 15 a 20 entradas en los brazos durante la sesión, pero una vez más similares entre grupos de animales controles y transgénicos, además con ambas dosis de tratamiento (Figura 17 b).



*Figura 17. Comportamientos de alternancia espontánea en el laberinto en Y de ratones controles y APPswe después de un mes de tratamiento con NeuroEPO IN, a los 13 meses de edad (a) o a los 14 meses de edad, después de dos meses de tratamiento (b). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$ contra el nivel de azar (50%), $n = 14-22$ por grupo. La prueba de t de una muestra.*

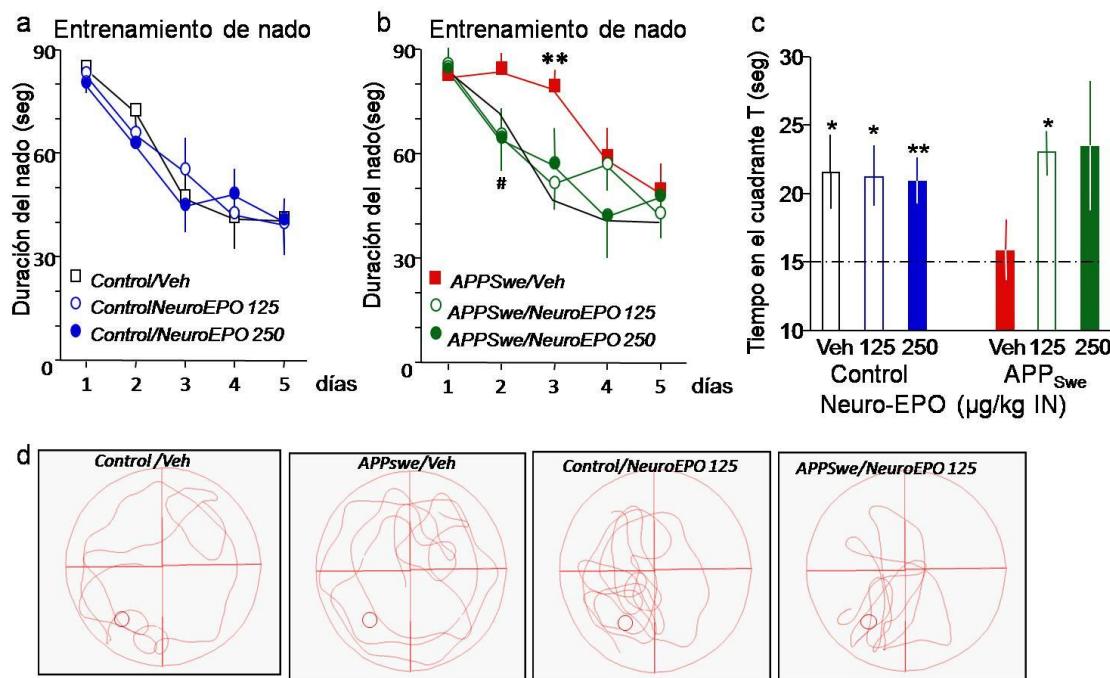
A continuación, se les realizaron a los animales la prueba de reconocimiento de nuevos objetos (Figura 18). Los datos fueron tratados en términos de número de contactos (Figura 18 a) y la duración de los contactos (Figura 18 b). En sesión 3, cuando el objeto en la posición 2 fue sustituido por uno nuevo, los animales control mostraron una fuerte preferencia por el objeto nuevo, mientras que los ratones APPswe tratados con vehículo no lo hicieron, para ambos parámetros. En los ratones APPswe, el tratamiento con NeuroEPO en la dosis 125 µg / Kg restauró significativamente la preferencia para el nuevo objeto (Figura 18 b), pero la dosis más alta no lo hizo.



*Figura 18. Déficit de reconocimiento de nuevos objetos en ratones control y APPswe después de 2 meses de tratamiento con NeuroEPO IN. La preferencia se analiza en términos de contactos con los objetos (a, b) o la duración de los contactos (c, d) durante la sesión 2 con dos objetos idénticos (a, c) y la sesión de 3 con un objeto familiar y un objeto nuevo (b, d). **p <0,01, *p <0,05, la prueba de t de una muestra.*

El perfil de aprendizaje de los animales controles en el tanque de Morris disminuyeron progresivamente su latencia para alcanzar la ubicación de la plataforma, un efecto sin cambios en los grupos controles tratados con NeuroEPO como se muestra en la (Figura 19 a). Los ratones APPswe mostraron un retardado en el perfil de aprendizaje, las medidas de latencias durante los ensayos dos al cinco siendo más alta que la observada para los animales controles, con una diferencia significativa en la prueba del día tres (Figura 19 b). El tratamiento con NeuroEPO, con ambas dosis, tendió a disminuir este retraso.

La calidad de la memoria se midió en un ensayo, realizado sin la plataforma 24 horas después de la última prueba de entrenamiento (Figura 19 c). Todos los animales controles mostraron una exploración significativamente preferencial del cuadro (T), pero no los ratones APPswe tratados con vehículo. El tratamiento con NeuroEPO resultó en una restauración de la presencia en el cuadro T para ambas dosis, con un efecto significativo en la dosis 125 μ g / Kg (Figura 19 c). De hecho, las trayectorias típicas se presentan en la (Figura 19 d) ilustra que mientras que un ratón APPswe tratado con vehículo explora los cuatro cuadros durante el 1-min de duración de la natación, un ratón tratado con NeuroEPO en la dosis 125 μ g / Kg está enfocado en el cuadro T.



*Figura 19. Lugar de aprendizaje en el laberinto de agua en ratones control y APPswe después de 2 meses de tratamiento con NeuroEPO IN. (a y b) los perfiles de aprendizaje, (c) prueba sin la plataforma y (d) típicas huellas de natación durante la prueba sin la plataforma. En (c), el nivel azar (15 seg) se perfila con una línea discontinua. **p <0,001; *p <0,01; #p <0,01 la prueba t-test de una muestra.*

Análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos

La peroxidación de lípidos se incrementó significativamente $p < 0,05$, en los ratones APPswe en comparación con los controles como se muestra en la (Figura 20) y el tratamiento con NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ IN previno de manera significativa $p < 0,01$ este aumento. No se detectó efecto con el tratamiento de NeuroEPO en los animales controles sanos.

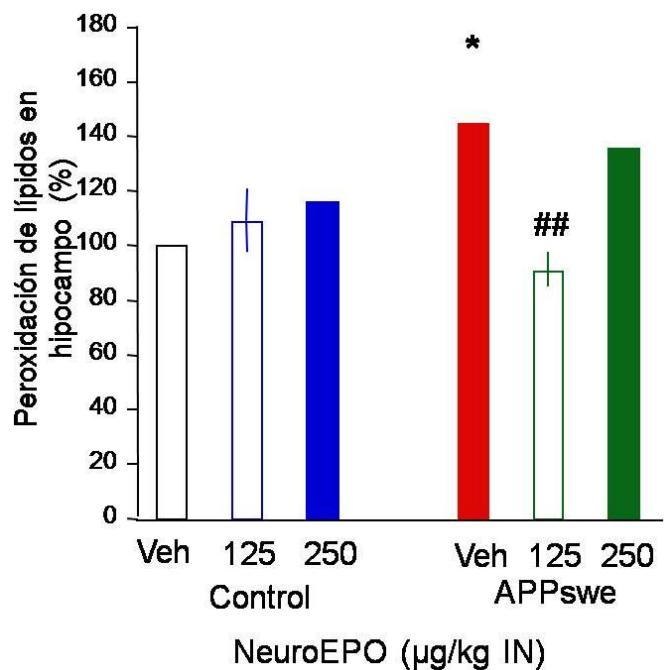


Figura 20. Efecto de NeuroEPO en ratones APPswe después de 2 meses de tratamiento sobre el nivel de peroxidación lipídica en el hipocampo. * $p < 0,05$, contra el grupo control/vehículo; ## $p < 0,01$ contra grupo APPswe / vehículo. Prueba de Dunnett

La neuroinflamación se evaluó por una medida directa de GFAP, marcador de astrocitos reactivos, e Iba-1, marcador de microglia reactiva (Figura 21). Ambos marcadores se incrementaron significativamente en el hipocampo de ratones APPswe en comparación con los controles. El tratamiento con NeuroEPO disminuyó significativamente la expresión de GFAP a dosis 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ en los grupos de animales controles y los

transgénicos (Figura 21 a), $p < 0,05$ y la expresión de Iba-1 en ambas dosis ensayadas sin modificaciones en el grupo control (Figura 21 b).

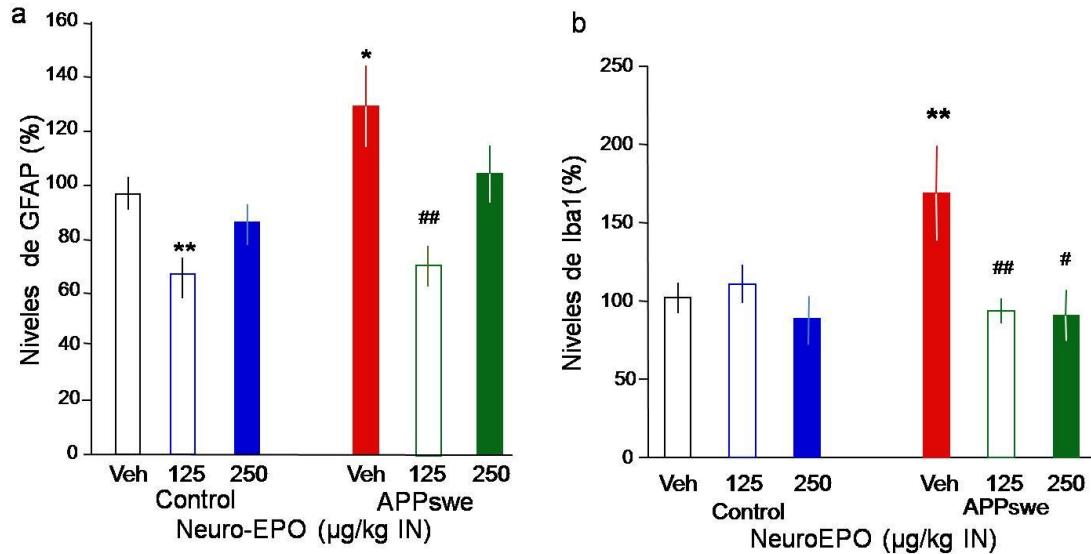


Figura 21: Efecto de la NeuroEPO en ratones APPswe después de 2 meses de tratamiento en los niveles de la expresión de GFAP (21a) y la expresión de Iba1(21b) en el hipocampo. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ contra el grupo control /vehículo; Prueba de Dunnnett.

El análisis de la reacción de las neuroglías usando el estudio inmunohistoquímico de GFAP se llevó a cabo en el hipocampo de los ratones. Se observó el inmunomarcaje con GFAP en el hilio, en los estratos moleculares, oriens y radiatum de la formación del hipocampo en las capas de células piramidales en todas las regiones de CA1-3 y en el giro dentado. El marcaje se expresó moderadamente, en todas las regiones estudiadas, en los ratones control tratados con vehículo (Figura 22 a, b). El tratamiento con NeuroEPO en ambas dosis, tendió a disminuir el marcaje (Figura 22 c, f). En los ratones APPswe tratados con vehículo el marcaje particularmente en el hilio y estrato oriens apareció notablemente más intenso y denso (Figura 22 g, h). El tratamiento con NeuroEPO, en particular en la dosis de 125 µg / Kg (Figura. 22 i, j), también en la dosis

de 250 µg/Kg (Figura 22 K, l) disminuyó el número de células que expresan GFAP y la intensidad del marcaje.

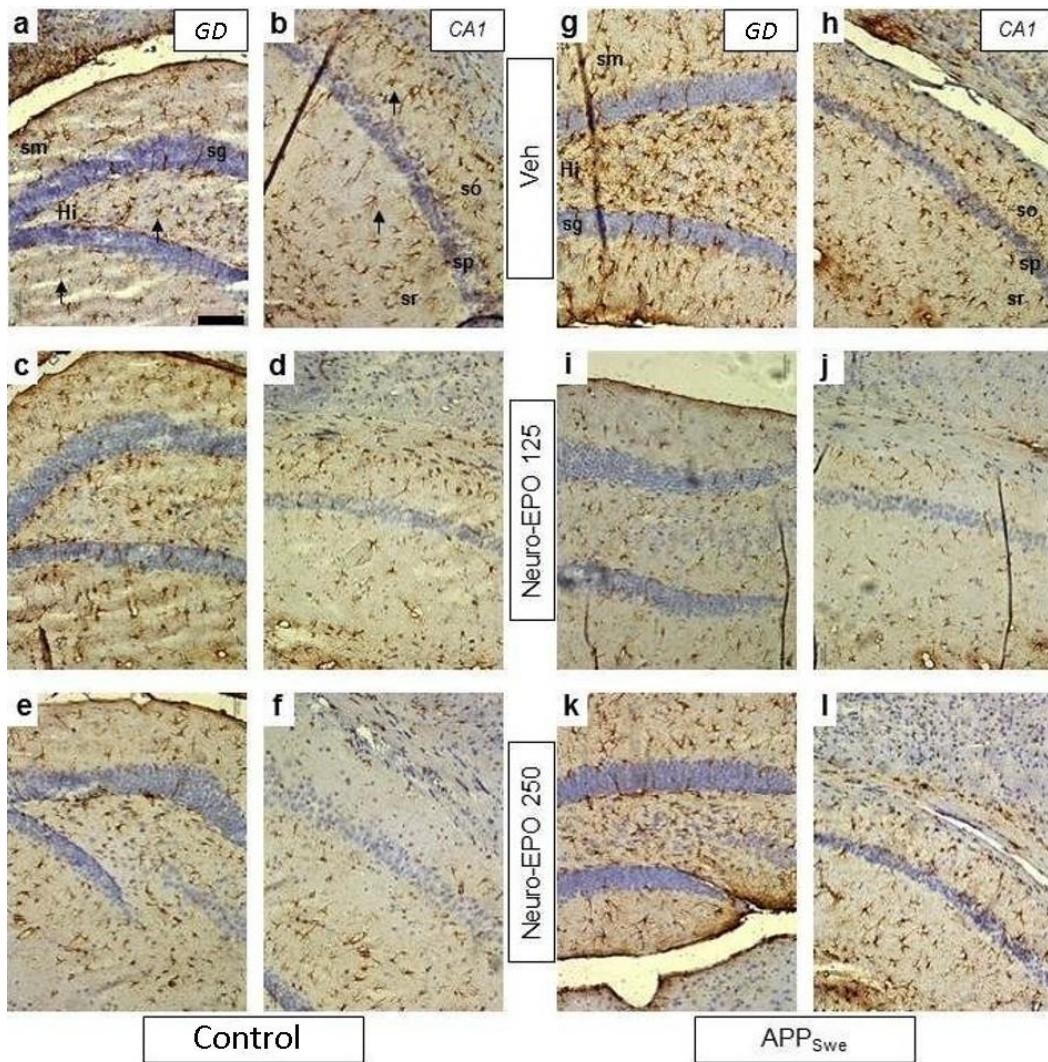


Figura 22. El análisis morfológico de la reacción de las neuroglías usando inmunomarcaje con GFAP en ratones APPswe tratados con NeuroEPO. Fotomicrografías muestran en dos áreas del hipocampo, el giro dentado (GD, a, c, e, g, i, k) y CA1 (b, d, f, h, j, l). Las flechas en (a, b) señalan células típicas que expresan GFAP. Escala en (a): 50 micras.

El análisis de la reacción de las microglías usando el estudio inmunohistoquímico de Iba1 se llevó a cabo en el hipocampo de los ratones (Figura 23). Se observó el inmunomarcaje con Iba1 en los estratos de la formación del hipocampo en las capas de

células piramidales en todas las regiones de CA1-3. El marcaje se dispersó moderadamente, presente en los ratones control tratados con vehículo (Figura 23 a). El tratamiento con NeuroEPO en ambas dosis, no cambió o tendió a disminuir el marcaje moderadamente (Figura 23 b y c). En ratones APPswe tratados con vehículo el marcaje apareció menos intenso (Figura 23 d). El tratamiento con NeuroEPO, en particular en la dosis de 125 µg / Kg (Figura 23 e), disminuyó el número de células y la intensidad del marcaje que expresan Iba1, no así en la dosis de 250 µg / Kg (Figura 23 f).

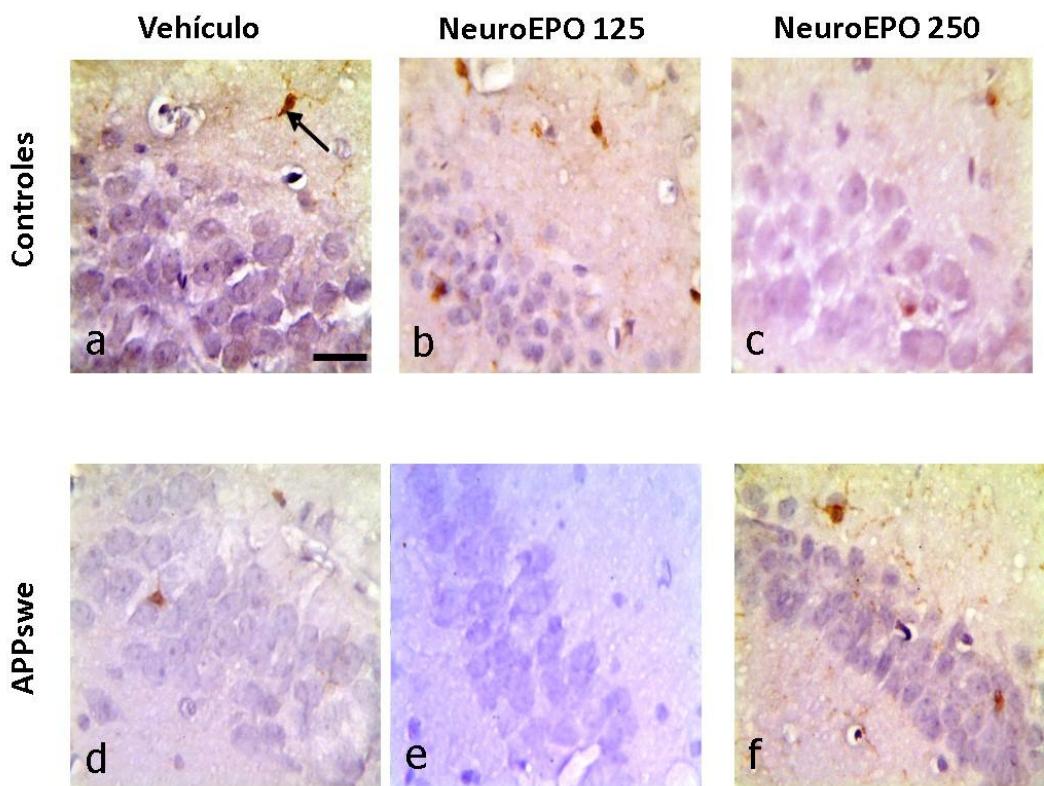


Figura 23. El análisis morfológico de la reacción de la microglia usando inmunomarcaje con Iba1 en ratones APPswe tratados con NeuroEPO. Fotomicrografías muestran en área CA1 del hipocampo. La flecha señala célula típica que expresa Iba1. Escala en (a): 50 micras.

En la Figura 24 representa un aumento de los niveles de Bax en ratones APPswe en comparación con los controles. El tratamiento con NeuroEPO impidió el aumento de

Bax, con un efecto significativo $p < 0,01$ en la dosis de 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ (Figura 24 a). Los niveles de Bcl-2 aparecieron disminuidos muy significativamente $p < 0,001$ en todos los grupos en comparación con los animales control tratados con vehículo (Figura 24 b). Como resultado, la relación de Bax/Bcl-2, calculada para cada animal, mostró un aumento significativo $p < 0,05$ en los ratones APPswe y normalizado con el tratamiento con NeuroEPO (Figura 24 c).

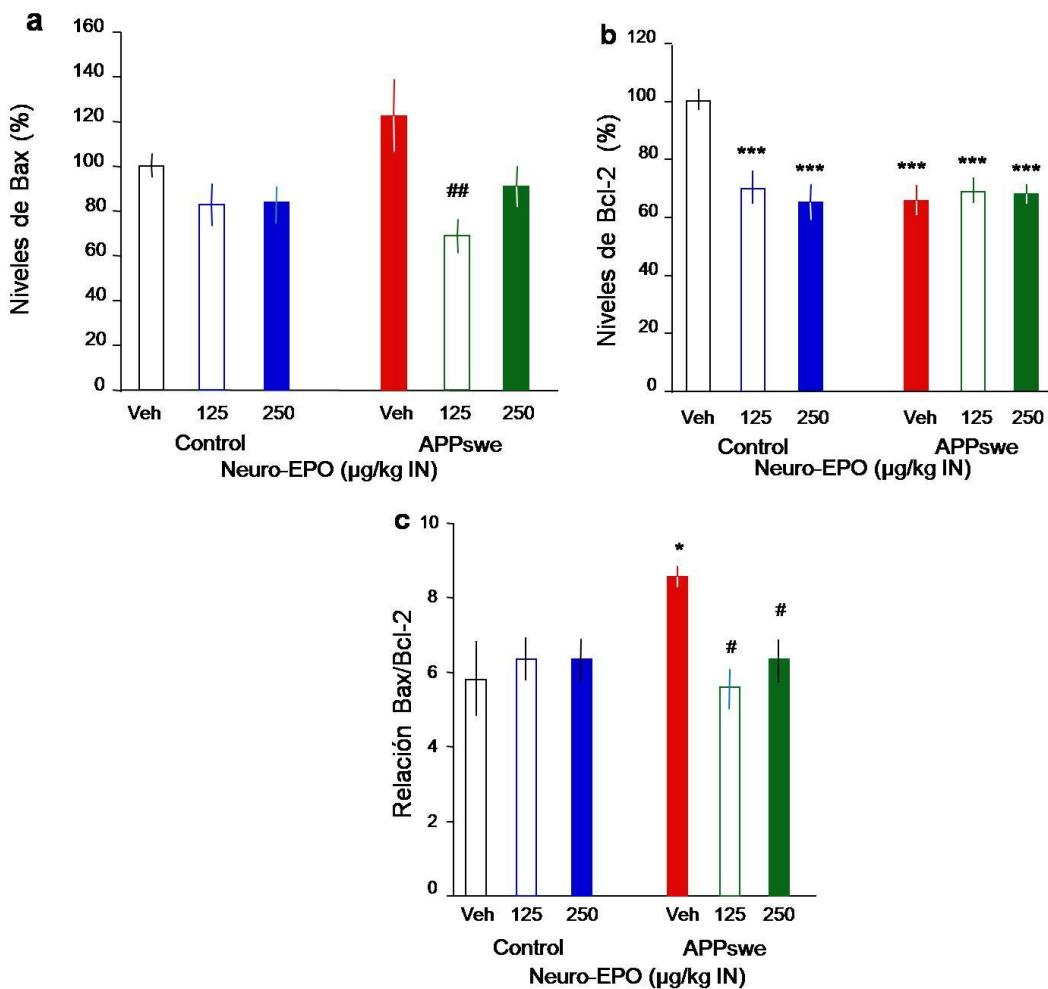


Figura 24. Efecto de la NeuroEPO sobre los niveles de proteínas anti y proapoptóticas en hipocampo de ratones APPswe después de 2 meses de tratamiento en: (a) Niveles de Bax, (b) niveles Bcl-2, (c) Relación de Bax / Bcl-2, en el hipocampo. ANOVA de dos vías * $P < 0,05$, ** $p < 0,001$ frente al grupo control / vehículo; ## $p < 0,01$ frente al grupo APPswe / vehículo; Prueba de Dunnett.

Un aumento significativo $p<0,05$ en el nivel de TNF α medido en el hipocampo de los ratones APPswe en comparación con los controles se muestra en la figura 25. Se observó que el tratamiento con NeuroEPO tendía a evitar el incremento en los niveles de TNF α , aunque no tiene efecto significativo (Figura 25).

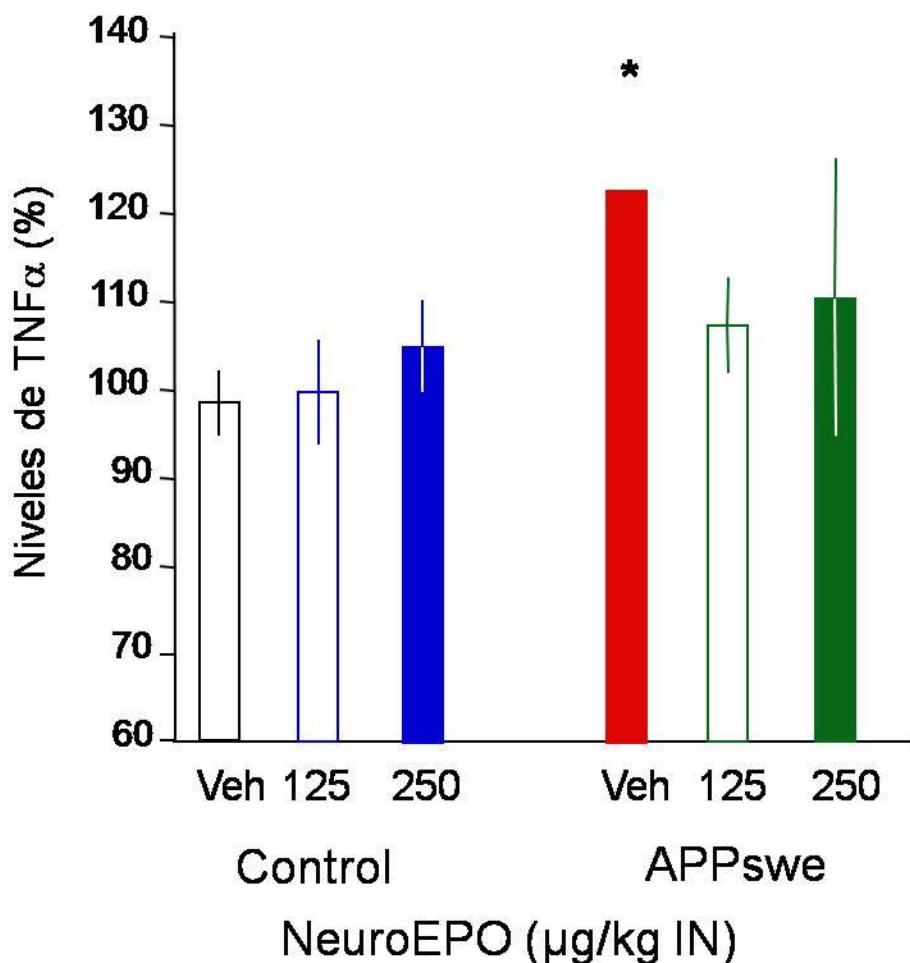


Figura 25. Efecto de la NeuroEPO en ratones APPswe después de 2 meses de tratamiento en los niveles de TNF α , en el hipocampo. ANOVA de dos vías $*p<0,05$ frente al grupo control/vehículo; Prueba de Dunnett.

Los niveles de FasL fueron mayor significativamente $p<0,01$ en los ratones APPswe comparado con los animales controles (Figura 26). Las dos dosis de NeuroEPO probadas disminuyeron los niveles de FasL, con una diferencia significativa $p<0,05$ en la dosis más baja ensayada comparada con los ratones APPswe tratados con vehículo. No se detectó efecto con el tratamiento de NeuroEPO en los animales controles sanos.

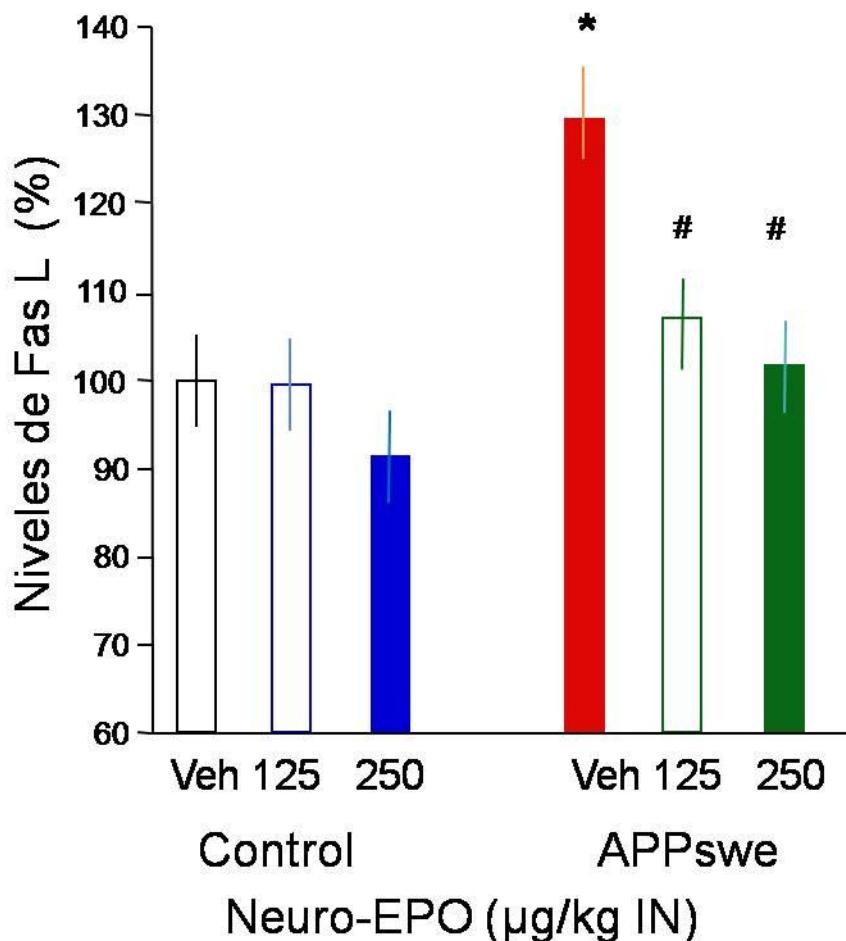


Figura 26. Efecto de la NeuroEPO en ratones APPswe después de 2 meses de tratamiento en los Niveles de FasL en el hipocampo. ANOVA de dos vías * $P <0,05$ frente al grupo control/vehículo, # $P <0,05$, frente al grupo APPswe/vehículo; Prueba de Dunnett.

Los resultados muestran un incremento significativo $p<0,05$ de la actividad de la Caspasa-3 en los ratones APPswe. La dosis de NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ disminuyó la actividad de la Caspasa-3 pero no así la más alta como se muestra en la figura 27.

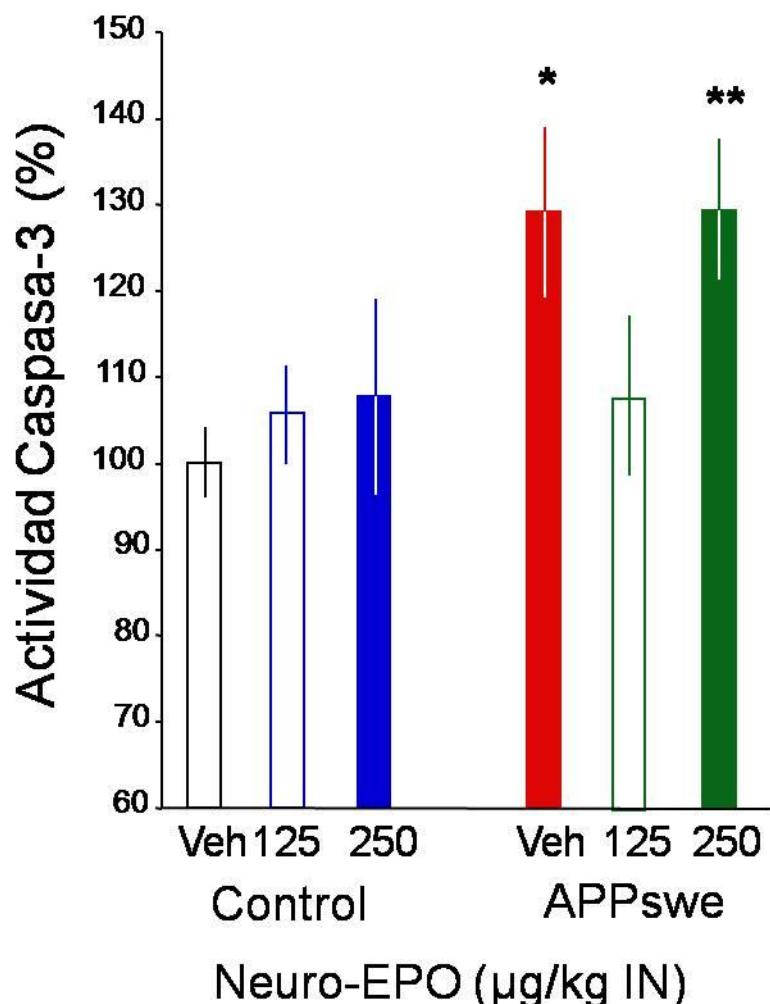


Figura 27. Efecto de la NeuroEPO en ratones APPswe después de 2 meses de tratamiento en la actividad de la caspasa-3 en el hipocampo. ANOVA de dos vías * $p <0,05$, ** $p <0,01$, frente al grupo control/vehículo; Prueba de Dunnett.

En la Figura 28 se presentan los resultados de la carga amiloidea tanto la fracción soluble como insoluble del péptido βA_{1-42} . El tratamiento en la dosis de NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, tendió a disminuir el contenido βA_{1-42} soluble (-56%) y disminuyó altamente significativo $p<0.001$ el nivel de βA_{1-42} insoluble. Una disminución -83% se midió en la corteza cerebral de los ratones a esta dosis y sólo una disminución de -37% a 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ (Figura 28 b).

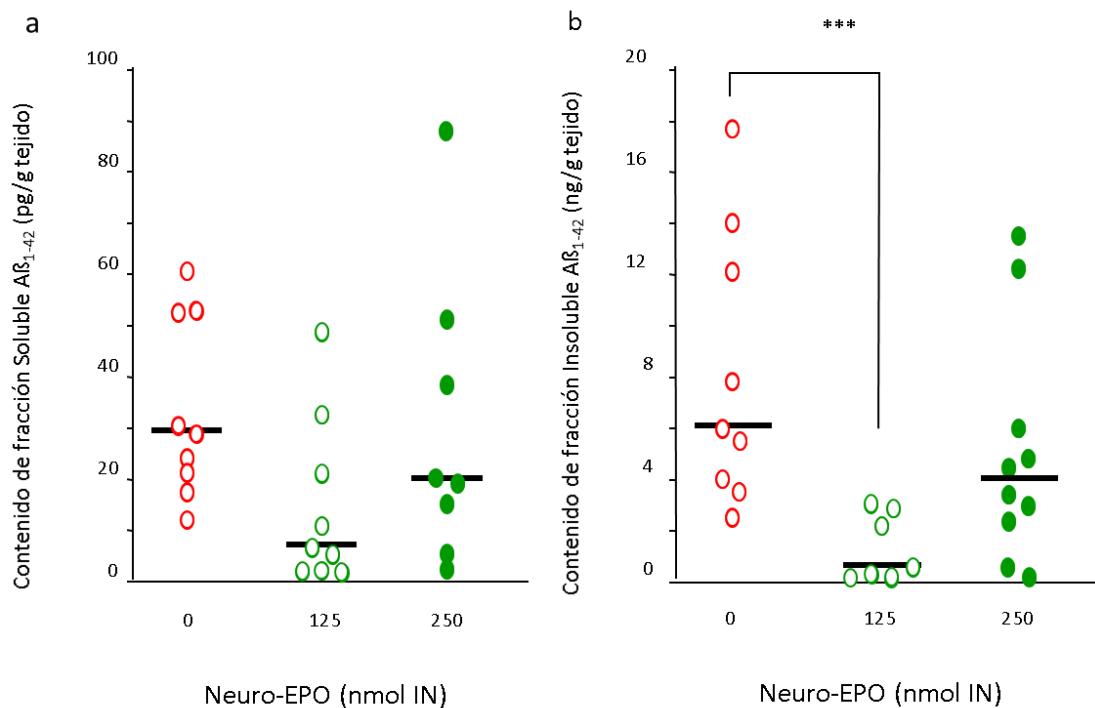


Figura 28. Análisis del contenido de βA_{1-42} en la corteza del ratón: (a) contenido soluble y (b) contenido insoluble βA_{1-42} . $n = 7-10$ por grupo, Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 5,86$, $p > 0,05$ en (a), $H = 10,9$, $p < 0,01$ en (b). *** $P < 0,001$ contra ratones APPswe tratados con vehículo. Prueba de U de Mann-Whitney.

En todos los animales APPswe tratados con vehículo se encontraron placas amiloideas de gran tamaño similares a las descritas con esta técnica en la literatura, en las regiones motora y auditiva de la corteza cerebral. Los animales APPswe tratados con NeuroEPO dosis 125 μ g / Kg presentaron en todos los animales placas de menor tamaño. Los tratados con NeuroEPO 250 μ g / Kg mostraron menor número de placas y de un menor tamaño. Incluso en correspondencia con esto no se detectaron placas en un animal tratado con esta dosis (Figura 29).

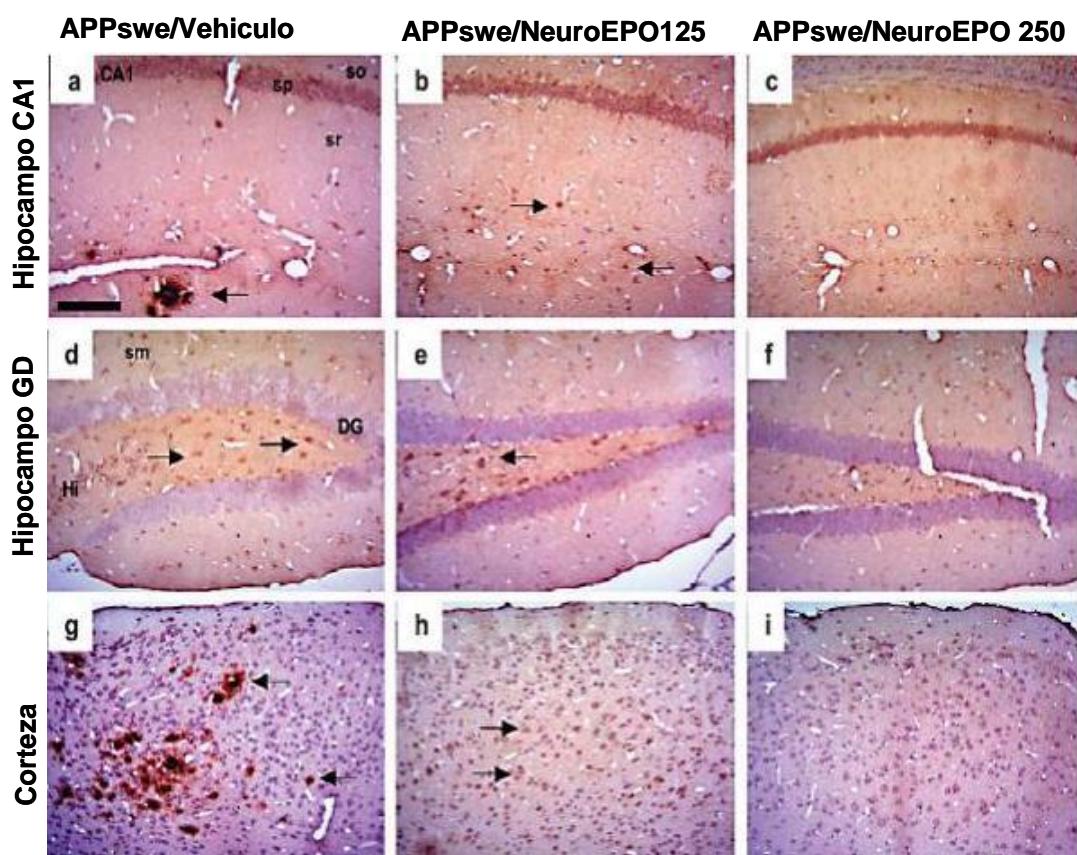


Figura 29. Expresión de placas amiloideas. a, b, c: región CA1 de hipocampo; d, e, f: giro dentado g, h, i: corteza parietal. Flechas en (a, d, g) se muestran las placas de núcleos densos en animales transgénicos tratados con vehículo. (b, e, h) las flechas indican placas de menor tamaño en hipocampo, giro dentado y corteza en los animales tratados con NeuroEPO dosis 125 μ g / Kg y no se detectan placas similares a dosis de NeuroEPO 250 μ g / Kg. Barra 50 μ m magnificación 200x.

En la Figura 30 se evidencia la disminución de la densidad de placas de núcleo denso β A evaluada por mm^2 como un marcador de la enfermedad, en la corteza cerebral descendió el número de placas por unidad de área en el grupo tratado con NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ y esa disminución se hizo más evidente en el grupo tratado con NeuroEPO 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ respecto al APPswe tratado con vehículo. En el hipocampo no se observó en gran medida este desbalance porque tanto en el grupo APPswe vehículo como en el tratado con NeuroEPO 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ la densidad por unidad de área es la misma, pero sí se evidenció la disminución para el grupo tratado con NeuroEPO 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ a pesar de no observarse en gran magnitud como en la corteza cerebral.

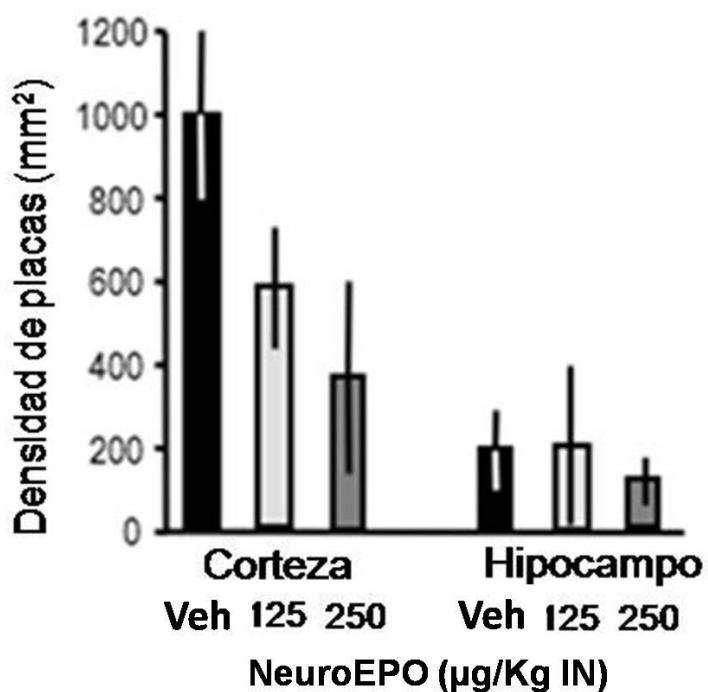


Figura 30. Densidad de placas β A por mm^2 en corteza cerebral e hipocampo del ratón APPswe. Se observa la disminución de la densidad de placas amiloideas en la corteza de los animales tratados con NeuroEPO dosis 125 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ y NeuroEPO 250 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, respecto al grupo APPswe tratado con vehículo.

DISCUSIÓN

En este estudio se observó que el aprendizaje y la memoria después de uno y dos meses de tratamiento mejoraron significativamente utilizando la respuesta de la alternancia espontánea, el reconocimiento de objetos y en el lugar de aprendizaje en el laberinto de agua. Los resultados confirmaron un efecto beneficioso de la aplicación de NeuroEPO en todas las respuestas medidas.

El efecto positivo de la NeuroEPO sobre memoria de trabajo espacial, disminuyendo el déficit se observó significativamente al mes de tratamiento y con ambas dosis de NeuroEPO logrando un efecto significativo en el segundo mes de tratado. Los déficits de memoria de referencia y la memoria de reconocimiento espacial también mejoraron al final del tratamiento, pero con efectos significativos observados para la dosis de NeuroEPO más baja ensayada. Está descrita la pérdida de la capacidad de la cognición, sobre todo en patologías neurodegenerativas.

La NeuroEPO se administró durante 2 meses en ratones transgénicos APPswe. Los animales se utilizaron en una edad en que la patología está progresando rápidamente, con el objetivo de simular la terapéutica en los seres humanos cuando los signos clínicos ya están presentes. En esta línea de ratón, los ONF y la pérdida neuronal están ausentes o muy limitada. Pero el deterioro cognitivo está presente desde 6 meses, así como, el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo a largo plazo. La pérdida de memoria es entonces progresiva y claramente establecida en edades mayores de 10-12 meses¹⁶³.

La pérdida sináptica y la disminución de la potenciación a largo plazo son, en efecto observadas en el área CA1 del hipocampo a los 4-5 meses de edad¹⁶⁴, en un principio en

el giro dentado después de la estimulación y luego en toda la formación del hipocampo¹⁶⁵. Los cerebros de los ratones presentan una neuroinflamación intensa, con astrocitos reactivos y microglías, a lo largo de la formación, frontal, occipital y corteza entorrinal del hipocampo a edades mayores de 10 meses. Numerosos depósitos de placas de β A intraparenquimatosas y la acumulación de especies de β A se observan a esta edad¹⁶⁶.

En estudios *in vitro*, *in vivo* en modelos transgénicos de la EA, la EPOhr permite no sólo la neuroprotección sino también la modificación de la enfermedad y la regeneración¹⁶⁷. La EPO reduce el estrés oxidativo, la hiperfosforilación de Tau, y la apoptosis inducida por péptidos β A aplicadas en células de neuroblastoma SH-SY5Y, células de feocromocitoma PC12 o cultivos neuronales primarios del hipocampo, especialmente a través de la ruta de NF- κ B p65^{168,169}. En un experimento *in vivo*, se administró EPOhr a ratones APPswe durante un corto período de 5 días. El tratamiento fue eficaz en la reversión de los déficits de memoria contextuales en los ratones, en el aumento de la proliferación endotelial, la expresión de la densidad capilar y sinaptofisina, y en la disminución de los niveles de receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y la cantidad de placas de amiloide y especies de β A¹⁷⁰. La corta duración del tratamiento de solo cinco días, con una dosis de EPOhr (5000 UI / Kg / día, IP), el momento después de la administración para evaluar los animales de 14 días y la edad de los ratones (13 meses, cuando la patología progresó rápidamente), sugirió una eficacia de la EPOhr.

Más recientemente, la CEPO, una forma de EPOhr con siete residuos carbamilados de lisina y capaces de cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica, se ha comparado con EPOhr en una línea de ratones APPswe / PS1-DE9. En ese estudio se mostró después de

un tratamiento de 4 semanas en ratones de 5 meses, que tanto la CEPO y la EPOhr mejoran el reconocimiento de nuevos objetos, pero sólo la EPOhr disminuyó la cantidad de placas de amiloide y especies de β A. La CEPO no presenta efectos eritropoyéticos y el análisis de la expresión génica reveló que ambas formas regulan un número limitado de genes comunes, en particular genes implicados en la transmisión sináptica;**Error!**

Marcador no definido. Ese estudio confirma la eficacia de las diferentes formas de EPO en modelos de ratones transgénicos de EA, pero señaló diferencias en los mecanismos de neuroprotección inducidos por la EPOhr y sus formas no eritropoyéticas.

La sobreexpresión del A β 1-42 con depósitos de amiloide en el parénquima vascular y difuso, por ejemplo, no presentó problemas de memoria o pérdida de células¹⁷¹. Del mismo modo, los ratones mutantes que sobreexpresan presenilina-1 mostraron un aumento de los depósitos de A β 1-42, pero una toxicidad limitada y no hay déficit de aprendizaje¹⁷². Los ratones APPswe de 14-meses de edad mostraron importantes déficits de aprendizaje y la observación de que podrían ser aliviados significativamente con la CEPO es coherente con la actividad pleiotrópica de la EPOhr. La EPO promueve el aprendizaje y la memoria espacial en otros modelos de demencias provocados por la estreptozotocina¹⁷³.

En este estudio se observó que la NeuroEPO evita los aumentos en la peroxidación de lípidos o la inmunorreactividad GFAP e Iba-1 en el hipocampo de ratones APPswe. Estas observaciones son coherentes con los resultados anteriores que pueden representar sus efectos directos. Estudios anteriores con la EPOhr mostraron en modelos de trauma de la médula espinal y meningitis por neumococo que previene los daños celulares, incluyendo la peroxidación lipídica, inducida por especies reactivas de oxígeno o

nitrógeno^{174,175}. En los modelos de toxicidad de amiloide, la EPOhr preserva la integridad mitocondrial y por lo tanto reduce directamente la generación de estrés oxidativo¹⁷⁶. La EPOhr también aumentó varias actividades enzimáticas antioxidantes, incluyendo catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa en diferentes modelos patológicos¹⁷⁷. El mecanismo antioxidante aparece sin embargo depende del modelo y el contexto patológico. Además, algunos resultados sugieren claramente que la EPO puede atrapar directamente las especies reactivas de oxígeno¹⁷⁸. En los modelos EA, ningún efecto directo antioxidante se ha demostrado, pero los efectos indirectos podrían ser propuestos, ya sea a través del aumento de la inducción de la EPO en la producción eritrocítica y el agotamiento relacionado en la concentración sistémica de hierro¹⁷⁹, un efecto, no inducido por la NeuroEPO, o a través de su impacto en las células microgliales¹⁸⁰.

En este estudio se confirmó que la NeuroEPO disminuyó de forma eficaz la activación de los astrocitos y las microglias en el modelo APPswe. En estudios anteriores se demostró que la EPOhr regula la señalización de EPOR en las microglia, alterando directamente el estado reactivo de la célula. A través de la activación de la vía de Wnt1 / PI3-K / Akt1 / mTOR, la EPO se transloca la subunidad p65 de NK-kB en el núcleo y permite la iniciación de la expresión de genes anti-apoptóticos¹⁸¹. Se demostró en estudio previo que la microglia junto al complemento intervienen en la perdida temprana de la sinapsis en los ratones transgénicos¹⁸², efecto mejorado con la NeuroEPO.

En este estudio se abordaron ambas vías de la apoptosis intrínsecas y extrínsecas observándose los aumentos en los ratones APPswe del nivel de Bax o la relación de Bax / Bcl-2, así como se reduce de manera significativa por la NeuroEPO los niveles de

FasL, al menos para la dosis más baja, al nivel observado en los ratones controles. Como consecuencia, la actividad de la caspasa efectora en desencadenar la muerte apoptótica, caspasa-3, se redujo por la NeuroEPO con la dosis más baja. Similares impactos directos han sido reportados previamente en modelos *in vitro* de cultivos microgliales¹⁸³. La EPOhr activa la PI3-K / Akt1 vía Wnt1 / mTOR, que a su vez aumenta la fosforilación y la concentración en el citosol de Bad, reducida complejo Bad/Bcl-XL y el aumento de complejos Bcl-XL/Bax. La EPOhr, por lo tanto, protege la señalización mitocondrial relacionada con moléculas pro-apoptótica y vía extrínseca que implican receptores de muerte Fas y TNF α R^{184,185}.

Se analizó la carga amiloide en ratones APPswe, después del tratamiento NeuroEPO. Se observó visualmente que los depósitos de amiloide en la corteza disminuyeron notablemente en ambas dosis de NeuroEPO y en el hipocampo, a la dosis más alta probada. Los animales presentaron menos depósitos densos grandes como se observa en los ratones APPswe tratados con vehículo y como se esperaba en esta etapa de la patología. Los depósitos resultaron limitados al marcaje celular y en algunos animales tratados con NeuroEPO 250 μ g / Kg no se mostró ningún marcaje. La cuantificación de la carga amiloide usando un kit de ELISA en las concentraciones de la corteza confirmó que los animales tratados NeuroEPO presentaron menor contenido β A1-42, tanto para las formas solubles como las insolubles. Estos datos son coherentes con el informe previo de Armand-Ugón et al., que describe que la EPOhr, a 2500 UI / Kg, es decir, 105 mg / Kg, disminuyó la carga de placas $\text{A}\beta$ 1-40 soluble en ratones β APP/ PS1, Por lo tanto, la NeuroEPO parece ser tan eficaz como la EPOhr en la patología de β A.

En resumen, el presente estudio muestra que la NeuroEPO, al ser administrada sistemáticamente, previene alteraciones del comportamiento y los depósitos cerebrales

de β A inducidos por esta patología. La NeuroEPO disminuye el estrés oxidativo, la neuroinflamación y apoptosis en el cerebro del ratón APPswe.

Teniendo en cuenta todos los resultados encontrados con la aplicación nasal de NeuroEPO en este modelo transgénico de EA, se puede concluir que la NeuroEPO presenta un efecto neuroprotector mediante el bloqueo de las principales vías metabólicas que se ven afectados en esta enfermedad neurodegenerativa. La NeuroEPO intranasal aparece como un inductor de la neuroprotección endógena y una alternativa terapéutica contra EA.

CONSIDERACIONES GENERALES DE LA DISCUSIÓN

Desde el año 2009 fue postulado que el procedimiento con NeuroEPO por vía nasal revolucionaría el tratamiento de los desórdenes neurodegenerativos en el siglo XXI³⁴.

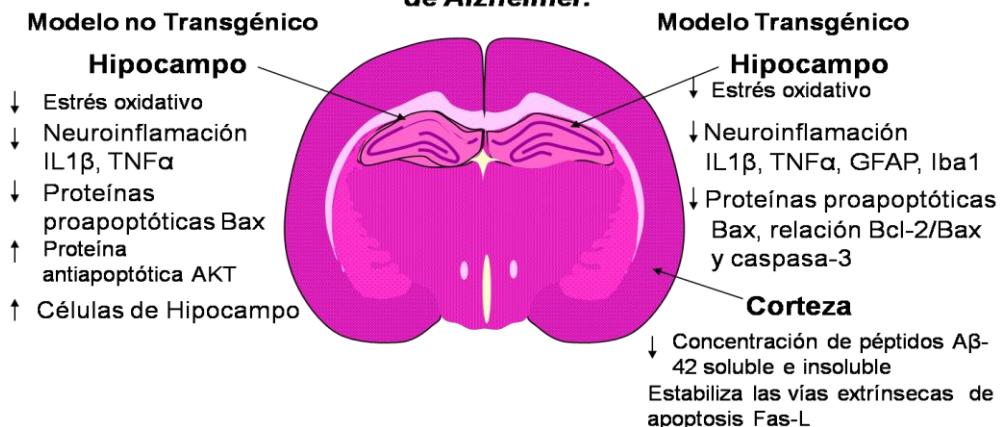
Los aportes de este trabajo en modelos *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer constituyen nuevas evidencias a favor de lo expresado.

A partir de los resultados experimentales presentados en este trabajo se confirma la hipótesis de que la potenciación de la neuroprotección endógena dispone de un potencial, no solo para la neuroprotección en sí misma, sino para la restauración neurológica. En este complicado mecanismo recientemente se demostró que la EPOhr juega un importante papel, promoviendo la plasticidad neuronal y rescatando la perdida de memoria espacial¹⁸⁶. Por estudios electrofisiológicos, estos mismos investigadores demuestran que la EPOhr puede actuar no solo como una sustancia neuroprotectora sino que puede modular los mecanismos de la plasticidad neuronal¹⁸⁷.

En la Figura 31 se muestra en forma simplificada como se puede integrar e interpretar el efecto de la NeuroEPO aplicada intranasal en biomodelos de la EA.

En el hemisferio izquierdo se representan los fundamentales efectos de la NeuroEPO a nivel molecular del biomodelo agudo provocando neurotoxicidad mediante la inyección ICV del péptido β A₂₅₋₃₅ y en el hemisferio derecho la acción en el biomodelo crónico transgénico de la EA.

Efecto de la NeuroEpo aplicada intranasal en modelos de la Enfermedad de Alzheimer.



- Mejora la memoria de trabajo espacial
- Mejora la memoria no espacial a largo plazo
- Mejora la memoria de referencia espacial

Figura 31. Esquema que muestra de forma resumida el efecto de la NeuroEPO aplicada por vía nasal en los modelos transgénicos y no transgénicos de la enfermedad de Alzheimer.

Lo común para ambos modelos está en que el tratamiento promovió aquellos mecanismos moleculares que favorecen la supervivencia celular, tales como la alta expresión de proteína antiapoptótica AKT y aumento de la sobrevivencia de las células del hipocampo y bloqueó los mecanismos que favorecen la muerte celular como la apoptosis, inflamación, estrés oxidativo. A juicio de la autora esta es una fuerte evidencia experimental que le confiere a este candidato a neurofármaco la capacidad de actuar de forma rápida, potenciando los mecanismos de la neuroprotección endógena.

Lo cual es posible, ya que la NeuroEPO constituye una molécula crítica en una de las encrucijadas metabólicas del cerebro Figura 32. Su presencia o no, puede determinar el desarrollo de procesos reparadores o preventivos o simplemente desencadenar procesos letales de carácter no reversibles como la apoptosis. Trabajos en genética molecular han evaluado la participación de la EPO en la regulación de genes del desarrollo neuronal,

homeostasis, proliferación celular, biogénesis mitocondrial, antioxidantes y citoprotectores^{188,189}.

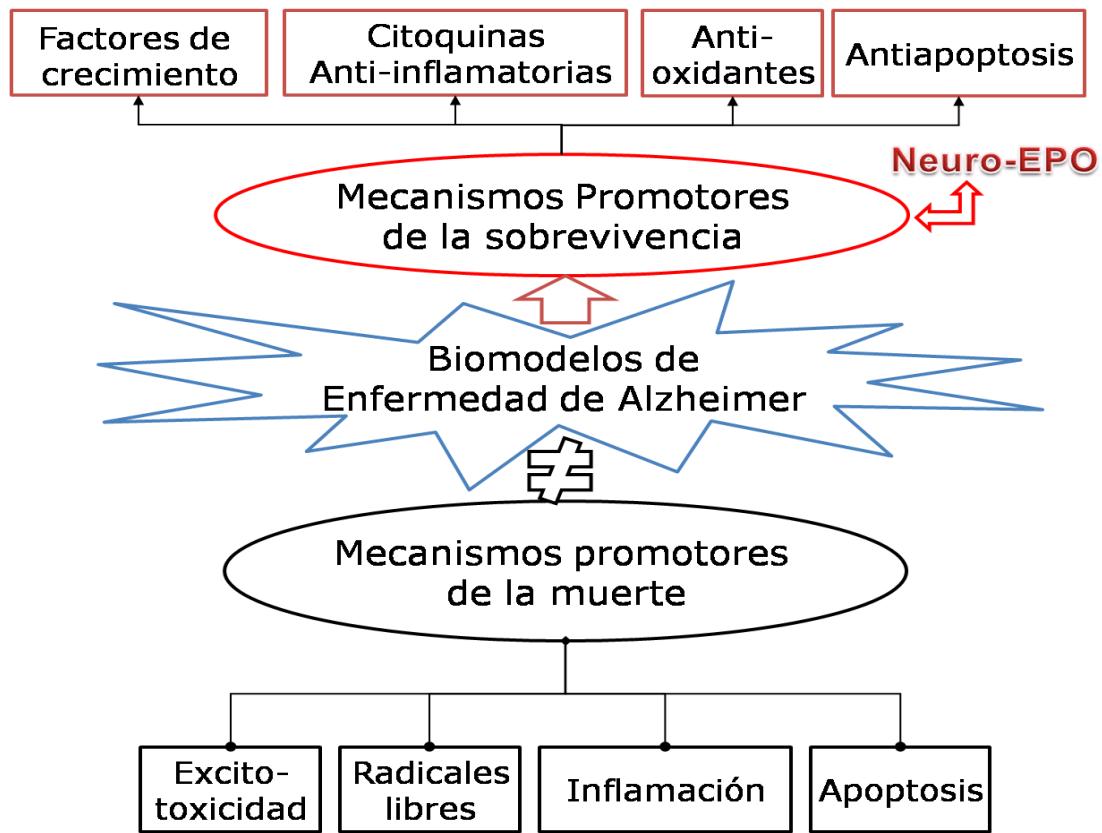


Figura 32. Esquema simplificado que muestra los efectos comunes que realiza la NeuroEPO aplicada por vía nasal a través de los cuales, se logra la Neuroprotección y la restauración neurológica en biomodelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer.

Una característica propia de la complejidad del cerebro y de lo limitada que es nuestra comprensión del mismo lo constituye el hecho experimental de las diferencias detectadas en la respuesta dada por la NeuroEPO en ambos modelos.

La explicación de estos resultados va más allá de los objetivos propuestos para este trabajo de tesis. Pero constituyen nuevas evidencias experimentales de los putativos mecanismos neuroquímicos que son modulados por la NeuroEPO directamente

relacionado con regiones específicas del cerebro y el daño causado en las mismas. Lo cual se puede interpretar como la respuesta a una alteración ocasionada por un xenobiótico exógeno o endógeno y la capacidad de respuesta para contrarrestar este efecto, que está entre otros factores modulada por la eritropoyetina endógena producida por pericitos, astrocitos y neuronas en el cerebro de los mamíferos;**Error! Marcador no definido..**

Existe una corriente de opinión que sugiere la enfermedad de Alzheimer no como una única patología, sino un grupo de síndromes con características finales parecidas, pero inicios diferentes, de ser cierta esta hipótesis la búsqueda de un fármaco único no tendría mayor sentido. Por tanto, es obvio proponer que el análisis de terapias combinadas debería de ser una segunda opción muy plausible.

Además de estas estrategias ampliamente investigadas y supuestamente en su apoyo, se necesita una neuroprotección general y eficaz para preparar al cerebro y estimular a los sistemas neuronales para entablar y hacer frente a los procesos neurodegenerativos. Se necesitan agentes con una amplia gama de efectos; debido a la toxicidad multifactorial, que implica la correspondiente apoptosis, excitotoxicidad, inflamación, falla de energía mitocondrial y la disfunción sináptica.

La NeuroEPO es en efecto prometedora considerando que carece, primero de actividad eritropoyética y así se limita a la citoprotección. Es nuestro criterio que una de las estrategias más prometedoras para lograr en el menor tiempo posible, el menor daño al cerebro. Sin lugar a dudas, esto constituye una alternativa terapéutica rápida y segura. El potenciar estos mecanismos para desarrollar las nuevas terapias a las patologías agudas

y crónicas, constituyendo la aplicación de la NeuroEPO una forma eficiente de potenciar la neuroprotección endógena en el cerebro dañado.

En segundo lugar, sus efectos protectores afectan no sólo neuronas sino también células gliales, que desempeñan un papel primordial en el despeje de la β A. La ruta IN de aplicación también constituirá una gran ventaja en la EA, permitiendo una administración fácil y confiable, incluso en pacientes con daños mayores.

CONCLUSIONES

1. La NeuroEPO aplicada por vía nasal a la concentración de 125µg/ml demostró ser un tratamiento efectivo, a través del restablecimiento de la homeostasis de la EPO endógena en poblaciones gliales y neuronales, eliminando los efectos moleculares, histológicos y cambios en la conducta propios de la enfermedad, en el modelo de Alzheimer por inyección intracerebroventricular del péptido amiloide β A 25-35.
2. La NeuroEPO logró similares evidencias de neuroprotección en el modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar en los mecanismos a través de los cuales ejerce su efecto neuroprotector.
2. Determinar la capacidad profiláctica de la NeuroEPO en modelos transgénicos y no transgénico de la enfermedad de Alzheimer.
3. Evaluar el impacto de este tratamiento en las vías acetil colinérgicas.
4. Evaluar la estabilidad de los resultados alcanzados con este modelo en el de cursar del tiempo.
5. Evaluar posibles sinergias con otras drogas o tratamientos hoy utilizados contra la enfermedad de Alzheimer.
6. Buscar evidencias clínicas del tratamiento con NeuroEPO en la enfermedad de Alzheimer.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ García Rodríguez JC. Neuroprotección en enfermedades neuro y heredo degenerativas. 2014; 7:10. Editorial OmniaScience. www.omniascience.com
- ² Haas M, Stephenson D, Romero K, Gordon MF, Zach N, Geerts H. Brain Health Big data to smart data in Alzheimer's disease: Real-world examples of advanced modeling and simulation. Modeling Initiative (BHMI). *Alzheimers Dement*. 2016; 9:1022-1030.
- ³ Bosch-Bayard RI, Llibre-Rodríguez JJ, Fernández-Seco A, Borrego-Calzadilla C, Carrasco-García MR, Zayas-Llerena T, Moreno-Carbonell CR, Reymond-Vasconcelos AG. Cuba's Strategy for Alzheimer Disease and Dementia Syndromes. *MEDICC Rev*. 2016; 18(4):9-13.
- ⁴ Sultzer, DL. Why apathy in Alzheimer's Matter. *Am J Psychiatry*. 2018; 175:298-300.
- ⁵ Llibre-Rodríguez JJ, Valhuerdi-Cepero A, López-Medina AM, Noriega-Fernández L, Porto-Álvarez R, Guerra-Hernández MA, Bosch-Bayard RI, Zayas-Llerena T, Hernandez-Ulloa E, Rodríguez-Blanco AL, Salazar-Pérez E, Llibre-Guerra JC, Llibre-Guerra JJ, Marcheco-Teruel B. Cuba's Aging and Alzheimer Longitudinal Study. *MEDICC Rev*. 2017; 19(1):31-35.
- ⁶ Goyal D, Kaur A, Goyal B. Benzofuran and índole: A promising scaffold for drug development in Alzheimer's disease. *ChemMedChem*. 2018; 10.1002:2974-2314.
- ⁷ Chiang K, Koo EH. Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014; 54:381-405.
- ⁸ Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. 2012; 148:1204-1222.
- ⁹ Folch J, Ettcheto. M, Petrov D, Abad S, Pedrós I, Marin M, Olloquequi J, Camins A. Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína - amiloide. *Neurología*. 2018; 33(1):47-58
- ¹⁰ Grossberg GT, Alva G, Hendrix S, Ellison N, Kane MC, Edwards J. Memantine ER Maintains Patient Response in Moderate to Severe Alzheimer's Disease: Post Hoc Analyses from a Randomized, Controlled, Clinical Trial of Patients Treated with Cholinesterase Inhibitors. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2018. May 16.

-
- ¹¹ Chong ZZ, Shang CS, Mu Y, Cui Sh, Yao Q, Maiese K. Targeting erythropoietin for chronic neurodegenerative disease. *Expert Opin. Targets.* 2013; 17(6):707-720.
- ¹² Kowsari R, Yazdian-Robati R, Marjan Razavi B, Pourtaji A, Gorbani M, Moghadam-Omraniipour H, Hosseinzadeh H, Lari P, Abnous K. Recognition and characterization of Erythropoietin binding-proteins in the brain of mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2016; 19: 946-952.
- ¹³ Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013; 27(1): 41-53.
- ¹⁴ Merelli A, Rodríguez JCG, Folch J, Regueiro MR, Camins A, Lazarowski A. Understanding the Role of Hypoxia inducible factor during neurodegeneration for new therapeutics opportunities. *Curr Neuropharmacol.* 2018 Jan 10.
- ¹⁵ Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: Dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiological Sciences.* 2000; 15: 225-229,
- ¹⁶ Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke.* 2004; 35: 1732-1737,
- ¹⁷ Alafaci C, Salpietro F, Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, et al. Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol.* 2000; 406: 219-225.
- ¹⁸ Lu D, Mahmood A, Qu C. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005; 22: 1011-1017.
- ¹⁹ Gorio A, Madaschi L, Di SB, Carelli S, Di Giulio AM, De BS. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 16379-16384.
- ²⁰ Diem R, Sattler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C. Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 2005; 128: 375-385.
- ²¹ Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 823-828.

-
- ²² Lipšic E, Schoemaker RG, van der Meer P, Voors AA, van Veldhuisen D, van Gilst WH. Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Dec 5; 48(11): 2161-2167.
- ²³ Ehrenreich H, et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry.* 2007; 12(2): 206-220.
- ²⁴ Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, et al. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate.* 2005; 87: 15-18.
- ²⁵ Scheiber K, Magyari M, Sellebjer F, Iversen P, Garde E, Madsen CG, Bornsen L, Christensen JR, Ratzer R, Siebner HR, Laursen B, Sorensen PS. High-dose erythropoietin in patients with progressive multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Multiple Sclerosis Journal.* 2017, 23(5):675-685.
- ²⁶ Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21: 857-864.
- ²⁷ Fantacci M, Bianciardi P, Caretti A, Coleman TR, Cerami A, Brines M, Samaja M. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced *in vivo* by severe chronic hypoxia. *PNAS.* 2006; 103: 17531-17536.
- ²⁸ Wang X, Zhu C, Wang X et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J. Neurochem.* 2004; 91(4): 900-910.
- ²⁹ Yu Gan, Juan Xing, Zheng Jing, R. Anne Stetler, Feng Zhang, Yumin Luo, et al. Mutant Erythropoietin Without Erythropoietic Activity Is Neuroprotective Against Ischemic Brain Injury Stroke. 2012; 43: 3071-3077.
- ³⁰ Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Meng Y, Zhang ZG, Qu C, et al. Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury. *JNeurosurg.* 2011; 114 :549-559.

-
- ³¹ Leconte C, Bihel E, Lepelletier FX, Bouët V, Saulnier R, Petit E, et al. Comparison of the effects of erythropoietin and its carbamylated derivative on behaviour and hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropharmacology*. 2011; 60: 354-364.
- ³² Armand-Ugón M, Aso E, Moreno J, Riera-Cordina M., Sánchez A, Vegas E, Ferrer I. Memory improvement in the AbPP/PS1 mouse model of familial Alzheimer's disease induced by carbamylated erythropoietin is accompanied by modulation of synaptic genes. *J Alzheimer Dis*. 2015; 45: 407-421.
- ³³ Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A Novel Side Of Erythropoietin Production. Oxygen-Dependent Production In Cultured Rat Astrocytes. 1994; 289(30): 19488-19493.
- ³⁴ García-Rodríguez, J.C. and I. Sosa-Teste, The Nasal Route as a Potential Pathway for Delivery of Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in Humans. *TheScientificWorldJOURNAL* 2009; 9: 970-981.
- ³⁵ Parra AL, Rodríguez JC. Nasal NeuroEPO could be a reliable choice for neuroprotective stroke treatment. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2012; 12: 60-68.
- ³⁶ Santos-Morales O, Díaz-Machado A, Jiménez-Rodríguez D, Pomares-Iturrealde Y, Festany-Casanovas T, González-Delgado CA, Pérez-Rodríguez S, Alfonso-Muñoz E, Viada-González C, Piedra-Sierra P, García-García I, Amaro-González D; NeuroEPO Study Group, García-Rodríguez JC, Sosa-Testé I, Lagarto-Parra A, Barrero-Viera L, David-Baldo M, Tamayo-Rodríguez M, Rivero-Vázquez I, González-Gamiz G, Martín-Trujillo A, Rodríguez-Fernández Y, Ledo-de la Luz AA, Álvarez-Delgado M, Howland-Álvarez I, Cruz-Gómez Y. Nasal administration of the neuroprotective candidate NeuroEPO to healthy volunteers: a randomized, parallel, open-label safety study. *BMC Neurol*. 2017 Jul 4;17(1):129.
- ³⁷ Cuban Public Registry of Clinical Trials. Evaluation of the safety and effect of treatment with intranasal NeuroEPO in patients with type 2 spinocerebellar ataxia. <http://registroclinico.sld.cu.sci-hub.io/ensayos/RPCEC00000187-Sp>.
- ³⁸ Cuban Public Registry of Clinical Trials. Safety and efficacy of NeuroEPO in patients with stroke. Phase I-II. <http://registroclinico.sld.cu.sci-hub.io/ensayos/RPCEC00000185-Sp>.
- ³⁹ Nuñez-Figueredo Y, Bueno V, Carrillo C, Jiménez N, Valdés O, Muñoz-Cernada A, Alonso E. Neuro protective effect of a nasal formulation of erythropoietin whit low sialic acid content. *Rev Cuba Farm*. 2009; 43: 1-13

-
- 40 Sosa I, Cruz J, santana J, Mengana Y, García-Salman JD, Muñoz A, Ozuna TG, García JC. Recombinat human erythropoietin with low sialic acid pathway to the central nervous system by nasal route in Meriones unguiculatus and no human primate Macaca Fascicularis models. Rev Salud Anim. 2008; 30: 39-44.
- 41 Sosa Teste I, Mengana Tamos Y, Rodríguez Cruz Y, Muñoz Cernuda A, Cruz Rodríguez J, Subirós Martínez N, Coro Antich RM, González-Quevedo A, García Rodríguez JC. Dose effect evaluation and therapeutic window of the NeuroEPO nasal application for the treatment of the focal ischemia model in the Mongolian gerbil. TheScientificWorldJOURNAL, 2012, 607498.
- 42 Yan Gao, Mengana Y, Rodríguez Cruz Y, Muñoz A, Sosa Teste I, García JD, Yonghong Wu, Julio César García Rodríguez and Cheng Gang Zhang. Different expression patterns of Ngb and EPOR in the cerebral cortex and hippocampus revealed distinctive therapeutic effects of intranasal delivery of NeuroEPO for ischemic insults to gerbil brain. Journal Histochemistry and Citochemistry. 2011; 59(2): 214-227.
- 43 Hernández CC, Burgos CF, Gajardo AH, Silva-Grecchi T, Gavilan J, Toledo JR, Fuentealba J. Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: the role of erythropoietin receptor. Neural Regen Res. 2017; 12(9): 1381-1389.
- 44 Fessel J. Amyloid is essential but insufficient for Alzheimer causation: addition of subcellular cofactors is required for dementia. Int J Geriatr Psychiatry. 2018 Jan;33(1): 14-21.
- 45 Santos-Morales O, Díaz -Machado M, Jiménez-Rodríguez D, Pomares-Iturralde Y, Festary-Casanova T, González-Delgado C.A, et al. Nasal administration of the neuroprotective candidate NeuroEPO to healthy volunteers: a randomized, parallel, open-label safety study. BMC Neurology. 2017; 17:129.
- 46 Brooks-Wilson AR. Genetics of healthy aging and longevity. HumGenet. 2013; 132(12):1323-1338.
- 47 Avgerinos KI, Kalaitzidis G, Malli A, Kalaitzoglou D, Myserlis PG, Lioutas VA Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment: a systematic review. J Neurol. 2018 Feb 1. doi: 10.1007/s00415-018-8768-0.
- 48 Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's Disease. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017:7039816. doi: 10.1155/2017/7039816.

-
- ⁴⁹ Spector CJ. Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age Ageing*. 2012; 41(5): 581-586.
- ⁵⁰ Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012; 8(1): 1-13.
- ⁵¹ Raz L, Knoefel J, Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016; 36: 172-186.
- ⁵² Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011; 7(3): 270-279.
- ⁵³ Patterson SL. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1beta, BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2015; 96: 11-18.
- ⁵⁴ Budson A E, Solomon P R. New Diagnostic Criteria for Alzheimer's disease and Mild Cognitive Impairment for the Practical Neurologist. *Pract Neurol*. 2012; 12(2): 88-96.
- ⁵⁵ Asai, H., S. Ikezu, S. Tsunoda, M. Medalla, J. Luebke, T. Haydar, B. Wolozin, O. Butovsky, S. Kugler and T. Ikezu. "Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation." *Nat Neurosci* 2015. 18(11): 1584-1593.
- ⁵⁶ Bolos, M., M. Llorens-Martin, J. Jurado-Arjona, F. Hernández, A. Rabano and J. Àvila "Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo." *J Alzheimers Dis*. 2016; 50(1): 77-87.
- ⁵⁷ Condello, C., P. Yuan, A. Schain and J. Grutzendler. "Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar Abeta 42 hotspots around plaques." *Nat Commun*. 2015; 6: 61-76.
- ⁵⁸ Baker-Nigh A, Vahedi S, Davis EG, Weintraub S, Bigio EH, Klein WL, Geula C. Neuronal amyloid-accumulation with in cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*. 2015; 138: 1722-1737.

-
- 59 Prieto GA, Snigdha S, Baglietto-Vargas D, Smith ED, Berchtold NC, Tong L, et al. Synapse-specific IL-1 receptor subunit reconfiguration augments vulnerability to IL-1beta in the aged hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 112, 716 5078-5087.
- 60 Simon E., Obst J., Gomez-Nicola D., The evolving dialogue of microglia and neurons in Alzheimer's disease: microglia as necessary transducers of pathology, *Neuroscience*. 2018; 01: 59.
- 61 Bisht, K., K. P. Sharma, C. Lecours, M. G. Sanchez, H. El Hajj, G. Milior, A. "Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states." *Glia*. 2016; 64(5): 826-839.
- 62 Maiiese K, Chong ZZ, Li F. Driving cellular plasticity and survival through the signal transduction pathways of metabotropic glutamate receptors. *Curr. Neurovasc. Res.* 2005; 2: 425-446.
- 63 Esmaeili Tazangi P, Moosavi SM, Shabani M, Haghani M. Erythropoietin improves synaptic plasticity and memory deficits by decrease of the neurotransmitter release probability in the rat model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015; 130: 15–21.
- 64 Gomez-Nicola D, Perry VH. "Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity." *Neuroscientist* 2015; 21(2): 169-184.
- 65 Shi C, Zhu J, Leng S, Long D, Luo X. Mitochondrial FOXO3a is involved in amyloid beta peptide-induced mitochondrial dysfunction. *J Bioenerg Biomembr*. 2016; 48:189-196.
- 66 Ischiropoulos C S, Radi H, Peroxynitrite biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drugs Discov*. 2007; 6:662-80.
- 67 Alzheimer. A. Z. *Ges. Neurol. Psychiat.* 1911; 4.
- 68 Alzheimer. A. *Allg. Z. Psychiatr.* 1907; 64.
- 69 Aisen, PS, Cummings J, Cliford R, Morris J C, Sperling R, Frölich, et al. On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2017; 9:60
- 70 Armstrong RA. What cause Alzheimer's disease? *Folia Neuropathol*. 2013; 51(3):169-188.
- 71 Reul, S., Lohmann, H., Wiendl, H., Duning, T., Johnen A. Can cognitive assessment really discriminate early stages of Alzheimer's and behavioural variant frontotemporal dementia at initial clinical presentation? *Alzheimer's Research & Therapy*. 2017; 9:61
- 72 Maiiese K. Forkhead transcription factors: new considerations for Alzheimer's disease and dementia. *J Transl Sci*. 2016; 2(4): 241-247.

-
- 73 Pospich S, Raunser S. The molecular basis of Alzheimer's plaques. An amyloid fibril structure provides insights into seniles amyloid plaque architecture. *Science Biochemistry*. 2017; 358:45-50.
- 74 Gomez-Nicola, D., N. L. Fransen, S. Suzzi and V. H. Perry. "Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration." *J Neurosci* 2013. 33(6): 2481-2493.
- 75 Askew, K., K. Li, A. Olmos-Alonso, F. Garcia-Moreno, Y. Liang, P. Richardson, T. et al "Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain." *Cell Rep* 2017. 18(2): 391-405.
- 76 Diaz, M., Fabelo, N., Martin, V., Ferrer, I., Gómez, T., Marín, R., Biophysical alterations in lipid rafts from human cerebral cortex associate with increased BACE1/ApPP interaction in early stages of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2015; 43:1185-1198.
- 77 Balducci C, Frasca A, Zotti M, La Vitola P, Mhillaj E, Grigoli E, et al. Toll like receptor 4 dependent glial cell activation mediates the impairment in memory establishment induced by beta-amyloid oligomers in an acute mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*. 2017; 60, 724 188-197.
- 78 Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol*. 1984; 2: 357- 369.
- 79 Saito T, et al. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Abeta43. *Nat Neurosci*. 2011; 14: 1023-1032.
- 80 Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *BiochemBiophys Res Commun*.1984; 122: 1131-1135.
- 81 Banati RB, Gehrmann J, Czech C, Monning U, Jones LL, Konig G, Beyreuther K, Kreutzberg GW. Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer beta A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. *Glia*.1993;9: 199-210.
- 82 Sandbrink R, Banati R, Masters CL, Beyreuther K, Konig G. Expression of L-APP mRNA in brain cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 695: 183-189.
- 83 Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann N Y Acad Sci*. 1996; 777: 281-287.
- 84 Salinero O, Moreno-Flores MT, Wandosell F. Increasing neurite outgrowth capacity of beta-amyloid precursor protein proteoglycan in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2000; 60: 87-97.

-
- 85 Fabelo, N., Martin, V., Marin, R., Santpere, G., Aso, E., Ferrer, I., Diaz, M. Evidence for premature lipid raft aging in APP/PS1 double-transgenic mice, a model of familial Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012; 71: 868-881.
- 86 Evin G, Sernee MF, Masters CL. Inhibition of gamma-secretase as a therapeutic intervention for Alzheimer's disease: prospects, limitations and strategies. *CNS Drugs.* 2006; 20: 351-372.
- 87 Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013; 22: 678-690.
- 88 Liu XJ, Wei J, Shang YH, Huang HC, Lao FX. Modulation of A β PP and GSK3 β by Endoplasmic Reticulum Stress and Involvement in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017; 57(4): 1157-1170.
- 89 Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends PharmacolSci.* 1991; 12: 383-388.
- 90 Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297: 353-356.
- 91 Avila J, de Barreda EG, Fuster-Matanzo A, Simon D, Llorens-Martin M, Engel T., et al. Looking for novel functions of tau. *BiochemSoc Trans.* 2012; 40: 653-655.
- 92 Ward SM, Himmelstein DS, Lancia JK, Binder LI. Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *BiochemSoc Trans.* 2012; 40: 667-671.
- 93 Sultana R, Robinson RA, Lange MB, Fiorini A, Galvan V, Fombonne J, Baker A, Gorostiza O, Zhang J, Cai J, Pierce WM, Bredesen DE, Butterfield DA. Do proteomics analyses provide insights into reduced oxidative stress in the brain of an Alzheimer disease transgenic mouse model with an M631L amyloid precursor protein substitution and thereby the importance of amyloid-beta-resident methionine 35 in Alzheimer disease pathogenesis? *Antioxid Redox Signal.* 2012 Dec 1; 17(11): 1507-1514.
- 94 Guy C. Brown and Peter H. St George-Hyslop. Deciphering microglial diversity in Alzheimer's disease. *Science.* 2017; 356(6343): 1123-1124.
- 95 Paolicelli, R. C., Jawaid A., Henstridge C. M., Valeri, A. Merlini, M., Robinson, J. L. et al TDP-43 Depletion in Microglia Promotes Amyloid Clearance but Also Induces Synapse Loss. *Neuron.* 2017; 95: 1-12.

-
- ⁹⁶ Hutton M, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*.1998; 393: 702-705.
- ⁹⁷ Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J. FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci*.2001; 18:702-714.
- ⁹⁸ Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, Ishiguro K, Yamaguchi H. Activation of tau protein kinase I/glycogensynthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res*. 1998; 31: 317-323.
- ⁹⁹ Braak H, Del Tredici K. Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's disease begin? *CurrOpin Neurol*. 2012; 25: 708-714.
- ¹⁰⁰ De La Monte SM. Metabolic derangements mediate cognitive impairment and Alzheimer's disease: role of peripheral insulin-resistance diseases. *Panminerva Med*. 2012; 54: 171-178.
- ¹⁰¹ Ahmad W. Overlapped Metabolic and Therapeutic Links between Alzheimer and Diabetes. *MolNeurobiol*.2013; 47: 399-424
- ¹⁰² De la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9:35-66.
- ¹⁰³ O'Neill C, Kiely AP, Coakley MF, Manning S, Long-Smith CM. Insulin and IGF-1 signalling: longevity, protein homoeostasis and Alzheimer's disease. *BiochemSoc Trans*. 2012; 40: 721-727.
- ¹⁰⁴ Takashima A, et al. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *ProcNatlAcadSci U S A*.1998b; 95: 9637-9641.
- ¹⁰⁵ Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol*. 2010; 223: 322-325.
- ¹⁰⁶ Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*.2008; 104: 1433-1439.
- ¹⁰⁷ Gao C., Holscher C., Liu Y, Li., LGSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. *Rev Neurosci*.2012; 23: 1-11.
- ¹⁰⁸ Mehan S, Meena H, Sharma D, Sankhla R. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. *J MolNeurosci* 2011; 43: 376-390.

-
- ¹⁰⁹ Fessel WJ. Concordance of several subcellular interactions initiates Alzheimer's dementia: their reversal requires combination treatment. *Alzheimer other Dementias. J Alzheimer's Dis.* 2017; 32(3): 166-181
- ¹¹⁰ Blanc F, Mahmoudi R, Jonveaux T, Galmiche J, Chopar, G, Cretin B, et al. Long-term cognitive outcome of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies: dual disease is worse. *Alzheimer's Research & Therapy.* 2017; 9:47.
- ¹¹¹ Brudno M, Poliakov A, Salamov A et al. Automated whole-genome multiple alignment of rat, mouse, and human. *Genome Res* 2004 14: 685-692.
- ¹¹² Willis-Owen SA, Flint J. The genetic basis of emotional behaviour in mice. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14: 721-728.
- ¹¹³ Duff K, Suleman F. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development? *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2004; 3: 47-59.
- ¹¹⁴ Jami J. Transgenic mice: a tool for the study of tissue-specific gene expression. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1988; 30: 7-11.
- ¹¹⁵ Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology.* 2008; 55(3): 363-389.
- ¹¹⁶ Lo EH. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol.* 2008; 153Suppl 1: S396-S405.
- ¹¹⁷ Zhai YF, Wu HQ, Lü D, Wang HQ, Wang HY, Zhang GL. The anti-aging effect of EPO and the preliminary probe into its mechanisms. *Nan Fang Yi Ke Da XueXueBao* 2012; 43(5): 679-682.
- ¹¹⁸ Fisher, J.W, Bridwell, B. J. Production of an erythropoietic factor by in situ perfused kidney. *ActaHaematologica.* 1961; 26(4): 224-232.
- ¹¹⁹ Fisher, J. W. Landmark advances in the development of erythropoietin. *Experimental Biology and Medicine.* 2010; 235(12): 1398-1411.
- ¹²⁰ Zanjani, E.D., Poster, J., Burlington, H., Mann, L.I., Wasserman, L.R. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1977; 89(3): 640-644.
- ¹²¹ Conrad, K. P., benyo, D.F., Wuesterhausen-Larsen, A., miles, k., Vetter, S.T., et al Expression of erythropoietin by human placenta. *The FASEB journal.* 1996; 10(7): 760-768.

-
- ¹²² Brines M, Cerami. A Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(6): 484–494.
- ¹²³ Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents *in vitro* glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997; 76(1): 105–116.
- ¹²⁴ Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1994;91(9): 3974–3978.
- ¹²⁵ Andrés A, Urrutia, Aqeela Afzal, Jacob Nelson, Olena Davinoff, Kenneth W. Gross, Volker H, Haase. Porlyl-4-hydroxylase 2 and 3 coregulate murine erythropoietin in brain pericytes. *Blood*. 2016; 128(21): 2550-2560.
- ¹²⁶ Sathyanarayana W, Dev P. A. Erythropoietin receptor response circuits. 2010 May; 17(3): 169-176.
- ¹²⁷ Maiese K, Chong ZZ, Yan Chen Shang, Shaohui Wang. Erythropoietin: New Directions for the Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 11102-11129.
- ¹²⁸ Bonnas Ch, Wüstefeld L, Winkle D, Kronstein-Wiedemann R, Dere E, Specht K, Boxberg M, Tonn T, Ehrenreich H, Stadler H, Sillaber I. EV-3, an endogenous human erythropoietin isoform with distinct functional relevance. *SCIENTIFIC REPORTSJ*. 2017; 7(3684): 1-15
- ¹²⁹ Rolfseng G, Navarro T, Bothe S, Wwhite L, Brathen G, Doeller C. Alzheimer's Disease. *Current Biology* 2018; 28: 635-655.
- ¹³⁰ Julio César García Rodríguez, Ramón Rama Bretón. NeuroEPO by Nasal Route as a Neuroprotective Therapy in Brain Ischemia. In *Acute Ischemic Stroke*. Edi. INTECH. 2012. cap:3, 59–78.
- ¹³¹ Miller WH A. Brain erythropoietin receptor expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J NeuropatholExp Neurol*. 2007; (66): 389-398.
- ¹³² Korzeniewski, S.J., Alfrad, E., Logan, J.W., Fichorova, R. N., Engelke, S., Kuban, K.C., et al. Elevated endogenous erythropoietin concentrations are associated with increased risk of brain damage in extremely preterm neonates. *PLoS One*. 2015; 10(3): 0115083.
- ¹³³ Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *BiochemPharmacol*. 2011; 82: 1291-1303.

-
- ¹³⁴ Suman JD. Current understanding of nasal morphology and physiology as a drug delivery target. *Drug Deliv Transl Res.* 2013;3(1): 4-15
- ¹³⁵ Williams GS. Intranasal drug delivery bypasses the blood-brain barrier. *Neurol Rev.* 2016; 24: 1,4041.
- ¹³⁶ Lochhead JJ, Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015; 35(3): 371-381.
- ¹³⁷ Scranton RA, Fletcher L, Sprague S, Jimenez DF, Digicaylioglu M. The rostral migratory stream plays a key role in intranasal delivery of drugs into the CNS. *PLoS One.* 2011 Apr 13;6(4): e18711.
- ¹³⁸ Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Antimisiaris SG, Chougule MB, Shoyele SA, Alexander A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release.* 2018; 281: 139-177.
- ¹³⁹ Consejo Canadiense de Protección de los animales. Guide lines for Breeding and Care of Laboratory Animals. World Health Organization and Institutional Council for Laboratory Animals Science (ICLAS). 1998.
- ¹⁴⁰ Maurice T, Lockhart BP and Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involve cholinergic dysfunction. *Brain Res* 1996;706: 181-193.
- ¹⁴¹ Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates, compact second edition, Elsevier Academic Press, London, UK. 2004.
- ¹⁴² ImageJ [computer program]. Version 1.34s. National Institutes of Health, USA: 2006.
- ¹⁴³ Sosa Testé I, García Rodríguez J. C., García Salman J D, Santana J, Subiros Martínez N, González Triana C, Rodríguez Cruz Y, Cruz Rodríguez J. Intranasal administration of recombinant human erythropoietin exerts neuroprotective effects on post-ischemic brain injury in mongolian gerbils. *Pharmacologyonline.* 2006; 1: 100-112.
- ¹⁴⁴ Parisa E, Seyed M, Mohamad S, Masoud H. Erythropoietin improves synaptic plasticity and memory deficits by decrease of the neurotransmitter release probability in the rat model of Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2015; 130: 15-21.

-
- ¹⁴⁵ Kamal A, Al Shaibani T, Ramakers G. Erythropoietin decreases the excitatory neurotransmitter release probability and enhances synaptic plasticity in mice hippocampal slices. *Brain Res.* 2011; 1410: 33-37.
- ¹⁴⁶ Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* 1996; 76: 105-116.
- ¹⁴⁷ Li G, Ma R, Huang C, Tang Q, Fu Q, Liu H, et al. Protective effect of erythropoietin on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *NeurosciLett.* 2008; 442(2): 143-147.
- ¹⁴⁸ Garzón F, Rodríguez Y, García JC, Rama R. Neuroprotective Effects of NeuroEPO Using an In Vitro Model of Stroke. *Behav.Sci.* 2018; 8:26.
- ¹⁴⁹ Chong ZZ, Kang J-Q, Maiese K. Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome-c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23(3): 320-330.
- ¹⁵⁰ Chang Ch, Chang YT, Huang CH W, Tsai Sh, Hsu Sh, Huang Sh, et al. Associations of Bcl-2 rs956572 genotype groups in the structural covariance network in early-stage Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* 2018; 10: 17.
- ¹⁵¹ Yao K, Wu J, Zhang J, Bo J, Hong Z, et al. Protective Effect of DHT on Apoptosis Induced by U18666A via PI3K/Akt Signaling Pathway in C6 Glial Cell Lines. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36: 801-809.
- ¹⁵² Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin Receptor-mediated Inhibition of Exocytotic Glutamate Release Confers Neuroprotection during Chemical Ischemia. *J Biol Chem.* 2001; 276(42): 39469-39475.
- ¹⁵³ Chong ZZ, Kang J-Q, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, bad, and caspase-mediated pathways. *Br. J Pharmacol.* 2003; 138: 1107-1118.
- ¹⁵⁴ Delpech J C, Wei L., Hao J., Yu, X., Madore C., Butovsky O., Kaffman A. "Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus." *Brain Behav Immun.* 2016; 57:79-93.

-
- ¹⁵⁵ Scodelaro Bilbao P, Boland R. Extracellular ATP regulates FoxO family of transcription factors and cell cycle progression through PI3K/Akt in MCF-7 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830: 4456–4469
- ¹⁵⁶ Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25(11): 577-83.
- ¹⁵⁷ Doens D, Valiente PA, Mfuh AM, X T Vo A, Tristan A, Carreño L, Quijada M, Nguyen VT, Perry G, Larionov OV, Lleonart R, Fernández PL. Identification of Inhibitors of CD36-Amyloid Beta Binding as Potential Agents for Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2017; 8(6): 1232-1241.
- ¹⁵⁸ Naert G, Rivest S. The role of microglial cell subsets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2011; 8(2): 151-155.
- ¹⁵⁹ Fluteau A, Ince PG, Minett T, Matthews FE, Brayne C, et al. The nuclear retention of transcription factor FOXO3a correlates with a DNA damage response and increased glutamine synthetase expression by astrocytes suggesting a neuroprotective role in the ageing brain. *Neurosci Lett*. 2015; 609: 11-17.
- ¹⁶⁰ Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, 14-3-3 protein and FOXO3a nuclear trafficking to preserve endothelial cell integrity. *Br J Pharmacol*. 2007; 150(7): 839-850.
- ¹⁶¹ Villard V, Espallergues J, Keller E, Alkam T, Nitta A, Yamada K, et al. Antiamnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid beta (25-35)-induced toxicity in mice. *Neuropsychopharmacol*. 2009; 34(6): 1552-1566.
- ¹⁶² Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G, et al. Time-Course and Regional Analyses of the Physiopathological Changes Induced after Cerebral Injection of an Amyloid β Fragment in Rats. *Am J Pathol*. 2011; 179(1): 315-334.
- ¹⁶³ Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, BA elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996; 274: 99-102.
- ¹⁶⁴ Lanz TA, Carter DB, Merchant KM Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis*. 2003; 13: 246-253.

-
- ¹⁶⁵ Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 5161-5166.
- ¹⁶⁶ Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. Microglial response to amyloid plaques in APPswe transgenic mice. *Am J Pathol*. 1998; 152: 307-1174 317.
- ¹⁶⁷ Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: A manifold task. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 2: 263-274.
- ¹⁶⁸ Chong ZZ, Li F, Maihese K. Erythropoietin requires NF- κ B and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during β -amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res*. 2005; 2: 387-399.
- ¹⁶⁹ Sun ZK, Yang HQ, Pan J, Zhen H, Wang, ZQ, Chen, SD, Ding JQ. Protective effects of erythropoietin on tau phosphorylation induced by beta-amyloid. *J Neurosci Res*. 2008; 86: 3018-3027.
- ¹⁷⁰ Lee ST, Chu K, Park JE, Jung KH, Jeon D, Lim JY, Lee SK, Kim M, Roh JK. Erythropoietin improves memory function with reducing endothelial dysfunction and amyloid- β burden in Alzheimer's disease models. *J Neurochem*. 2012; 120: 115-124.
- ¹⁷¹ McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. BA 42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*, 2005; 47: 191-199.
- ¹⁷² Maihese K. Regeneration in the nervous system with erythropoietin. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2016; 21: 561-596
- ¹⁷³ Hamidi, G., Arabpour, Z., Shabrang, M., Rashidi, B., Alaei, H., Sharifi, M.R., et al. Erythropoietin improves spatial learning and memory in streptozotocin model of dementia. *Pathophysiology*. 2013; 20: 153-158.
- ¹⁷⁴ Yazihan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. *Injury*. 2008; 39: 1408-1413.
- ¹⁷⁵ Barichello T, Simões LR, Generoso JS, Sangiogo G, Danielski LG, Florentino D, Et al. Erythropoietin prevents cognitive impairments and oxidative parameters in Wistar rats subjected to pneumococcal meningitis. *Transl Res*. 2014; 163: 503-513.

-
- ¹⁷⁶ Al-Qahtani JM, Abdel-Wahab BA, Abd El-Aziz SM. Long-term moderate dose exogenous erythropoietin treatment protects from intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits and hippocampal oxidative stress in young rats. *Neurochem Res.* 2014; 39: 161-171.
- ¹⁷⁷ Hou J, Wang S, Shang YC, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin employs cell longevity pathways of SIRT1 to foster endothelial vascular integrity during oxidant stress. *Curr Neurovasc Res.* 2011; 8: 220–235.
- ¹⁷⁸ Bailey DM, Lundby C, Berg RM, Taudorf S, Rahmouni H, Gutoski M et al. On the antioxidant properties of erythropoietin and its association with the oxidative-nitrosative stress response to hypoxia in humans. *Acta Physiol.* 2014; 212: 175-187.
- ¹⁷⁹ Goodnough LT. Erythropoietin and iron-restricted erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2007;35: 167-172.
- ¹⁸⁰ Bond WS, Rex TS Evidence that erythropoietin modulates neuroinflammation though differential action on neurons, astrocytes and microglia. *Front Immunol.* 2014;5: 523.
- ¹⁸¹ Shang YC, Chong ZZ, Wang S, Maiese K. Prevention of β -amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging* 2012; 4: 187-201.
- ¹⁸² Hong S, Beja-Glasser V F, Nfonoyim B M, Frouin A, Li S, Ramakrishnan K M. et al. "Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models." *Science* 2016. 352(6286): 712-716.
- ¹⁸³ Wu H, Wang H, Zhang W, Wei X, Zhao J, Yan P, et al. rhEPO affects apoptosis in hippocampus of aging rats by upregulating SIRT1. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(6): 6870-80.
- ¹⁸⁴ Li YP, Yang GJ, Jin L, Yang HM, Chen J, Chai GS, Wang L Erythropoietin attenuates Alzheimer-like memory impairments and pathological changes induced by amyloid β_{42} in mice. *Brain Res.* 2015; 1618: 159-167.
- ¹⁸⁵ Cevik, B, Solmaz V, Yigitteurk G, Cavusoglu T, Peker G, Erbas O. Neuroprotective effects of erythropoietin on Alzheimer's dementia model in rats *Adv Clin Exp Med.* 2017; 26(1): 23-29.
- ¹⁸⁶ Almaguer-Melian W, Mercerón-Martínez D, Pavón-Fuentes, N, Alberti-Amador E, Ledón - Martinez N, Delgado R, Ocaña S, Bergado-Rosado JA, Erythropoietin Promotes Neural Plasticity and

Spatial Memory Recovery in Fimbria-Fornix-Lesioned Rats. Neurorehabilitation and Neural Repair. 2015; 1-10.

¹⁸⁷ Almaguer-Melian W, Delgado-Ocana S, Pavón-Fuentes N, Ledón-Matinez N, Bergado-Rosado JA, EPO Induces Changes in Synaptic Transmission and Plasticity in the Dentate Gyrus of Rats. SYNAPSE. 2016; 70: 240–252.

¹⁸⁸ Gao L, Tian S, Gao H, Xu Y. Hypoxia increases Abeta-induced tau phosphorylation by calpain and promotes behavioral consequences in AD transgenic mice. J. Mol. Neurosci. 2013; 51: 138-147.

¹⁸⁹ Lu, T. *et al.*, RES and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. Nature. 2014; 507; 7493: 448-454.